Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

DER KÄLTESCHOCK BEI SYNCHRONER CHLORELLA: CHARAKTERISIERUNG, SEINE FOLGEN UND DIE BEDINGUNGEN EINER REGENERATION

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Rolf Rüdiger Nelle
aus Kassel

Göttingen 1976

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

DER KÄLTESCHOCK BEI SYNCHRONER CHLORELLA: CHARAKTERISIERUNG, SEINE FOLGEN UND DIE BEDINGUNGEN EINER REGENERATION

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Rolf Rüdiger Nelle
aus Kassel

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H. Lorenzen
Korreferent: Prof. Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 1976

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	1
EINLEITUNG	2
OBJEKT UND KULTURMETHODE	3
METHODEN	5
ERGEBNISSE	16
I. Die Bedeutung der äußeren Bedingungen für das Ausbleichen der Algen	16
1. Lage der empfindlichen Phase	16
2. Schocktemperatur	26
3. Schockdauer	26
4. Bedeutung des Lichtes	31
5. Bedeutung der Begasung	36
6. Nachbehandlungen	42
7. Zusatz von Chemikalien	50
II. Charakterisierung der Algen im Verlaufe des Normalzyklus, nach dem Kälteschock und während der Regeneration	52
1. Zellentwicklung und Nährlösung	52
2. Kohlenhydrat, Protein, Trockengewicht, Lipide	56
3. Pigmente	64
4. Photosynthese und Atmung	73
5. Absorptionsspektren	80
5.1 Absorption der Gesamtpigmente	81
5.2 Absorption der Zellen in vivo	83
5.3 Absorption bei Tieftemperatur	85
6. Fluoreszenzspektren	90
6.1 Fluoreszenz-Anregungsspektren	90
6.2 Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektren	94
7. PS I - PS II Aktivitäten von Partikeln	98
DISKUSSION	104
ZUSAMMENFASSUNG	113
LITERATUR	116

Verzeichnis der Abkürzungen

A_{678}	Absorption bei 678 nm
Asc	Ascorbinsäure
BSA	Rinderserumalbumin
Car	Carotin
Chl	Chlorophyll, Gesamtchlorophyll
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
DCMU	Dichlorphenyldimethylharnstoff
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DL	Dauerlicht
DPC	Diphenylcarbazid
E_{650}	Extinktion bei 650 nm
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
F_{722}	Fluoreszenz bei 722 nm
$F_{435 \rightarrow 684}$	Fluoreszenz bei 684 nm, Anregung bei 435 nm
FS	Fettsäure(n)
Ges.X	Gesamt-Xanthophyll
KH	Kohlenhydrate
LDW 14:10	Licht-Dunkel-Wechsel, 14 Std Licht, 10 Std Dunkel
Min	Minute(n)
MV	Methylviologen
N	Normal, Normalkultur
NL	Nährlösung
Pr	Protein
PS I, PS II	Photosystem I, II
Sek	Sekunde(n)
Std	Stunde(n)
TES	Tris-(hydroxy methyl)-methyl-2-aminoäthan-sulfonsäure
TG	Trockengewicht
X	Xanthophylle
ZZ	Zellzahl
rel.ZZ	relative Zellzahl

EINLEITUNG

Für pflanzenphysiologische Untersuchungen haben sich seit langem einzellige Grünalgen, insbesondere Chlorella, gut bewährt. Seit der Entwicklung von Synchronisationsmethoden (TAMIYA et al. 1953, LORENZEN 1957) ist es möglich, Erkenntnisse über Zusammensetzung oder physiologische Aktivitäten mit bestimmten Entwicklungsstadien des Lebenszyklus der Zelle zu korrelieren. Inzwischen liegen zahlreiche Ergebnisse von Untersuchungen an synchronen Einzellern vor (vgl. LORENZEN and HESSE 1974).

Über die Bedeutung der Temperatur, insbesondere an der oberen und unteren Grenze des Wachstums, berichteten LORENZEN und RUPPEL (1958), eine Zusammenfassung findet sich bei LORENZEN (1962, 1963). Bei Untersuchungen zur Wirkung von kurzzeitigen Temperaturerniedrigungen (Kälteschocks) entdeckte man im Entwicklungsverlauf von Chlorella pyrenoidosa eine auffallend empfindliche Phase (LORENZEN und RUPPEL 1958). Weitere Untersuchungen bestätigten, daß sich diese überraschende Empfindlichkeit der sonst so resistenten Alge um die 6. - 8. Std der Entwicklung anschließend unter Normalbedingungen durch starke Wachstumshemmung und durch völliges Ausbleichen der Zellen dokumentiert (PIRSON, LORENZEN and KOEPPER 1959).

Die Intensität des Ausbleichens konnte in direkte Beziehung zu äußeren Kulturbedingungen vor, während und nach der empfindlichen Phase gebracht werden (NELLE 1970).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die komplexe Natur des Kälte-Bleich-Effektes und die nachfolgende Regeneration unter verschiedenen Außenbedingungen näher zu charakterisieren.

OBJEKT UND KULTURMETHODE

Die Versuche wurden grundsätzlich mit Chlorella pyrenoidosa 211-8b der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen durchgeführt. Parallel erfolgten einige Kontrollversuche mit Scenedesmus obliquus 276-6/03, Chlamydomonas reinhardii 11-32/89, Ankistrodesmus braunii 202-7c und Scenedesmus acutus Tomaselli.
Die Anzucht erfolgte im Lichtthermostaten der Fa. KNIESE, Marburg (LORENZEN 1959) bei 32° C und ca. 18000 Lux (3 Philips Warmton de Luxe, TL 40W - 1/32 und 2 Philips Tageslicht TL 40W - 1/55), die Tieftemperaturbehandlung in einem parallelen Lichtthermostaten mit 4,5° C.
Die Algen wurden in Röhren aus Glas (100 ml oder 300 ml Volumen) kultiviert (KUHL and LORENZEN 1964); als Medium diente eine mineralische Nährlösung nach KUHL (1962), der das Eisen als Fe-EDTA-Komplex zugesetzt wurde (RUPPEL 1962). Die Temperaturanpassung beim Übergang von 32° C in 4,5° C und umgekehrt war innerhalb von 30 Min abgeschlossen (s. Abb. 1).

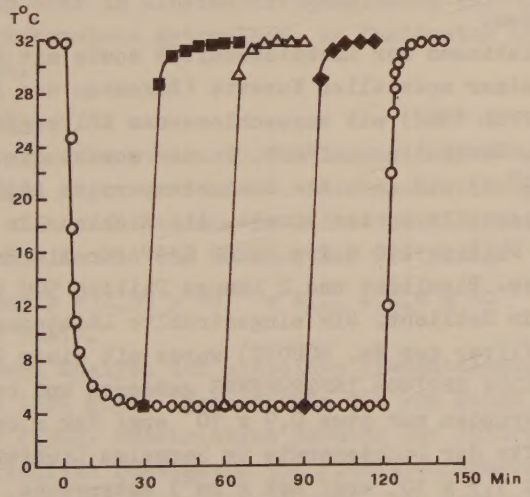

Abb. 1: Temperaturanpassung der Algensuspension bei Überführung von 32°C in 4,5°C u.u.

Die Kulturen wurden normalerweise mit einem Luft-CO_2-Gemisch begast, das maximal 3 % CO_2 enthielt. Bei Verwendung anderer Gasgemische wurden die zu mischenden Gase über Gasuhren (Fa. ELSTER & CO. AG Mainz) in einen Behälter geleitet und das Gasgemisch von dort an den Lichtthermostaten angeschlossen. Die für einige Versuche notwendige Begasung mit Stickstoff erfolgte durch direkten Anschluß einer Stickstoff-Flasche über ein Druckminderungsventil an den Lichtthermostaten. Synchronisiert wurde durch Licht-Dunkel-Wechsel (LDW) 14:10 und tägliche Verdünnung auf die rel.ZZ 100 (= 1,56 x 10^6 Zellen / ml Algensuspension) zu Beginn des Zyklus (LORENZEN 1957, 1963). Ausgangsmaterial für alle Versuche waren im normalen LDW 14:10 vorsynchronisierte Zellen.

Es wurde mit nichtsterilen Kulturen gearbeitet; für einzelne Schlüsselversuche wurden die Ergebnisse auch unter sterilen Bedingungen bestätigt. Die Ergebnisse stellen in der Regel Mittelwerte aus 8 bis 10 (bei Schlüsselversuchen z.T. noch mehr) Versuchen dar. Aus technischen Gründen konnten bestimmte Experimente wie etwa die Messung der Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektren (3 Messungen) nicht so häufig durchgeführt werden.
Versuche mit Variationen der Lichtintensität sowie mit Farblicht wurden in einer speziellen Kuvette (Eigenbau des Instituts, vgl. RUPPEL 1962) mit angeschlossenem Kälteaggregat (Fa. GEBR. HAAKE, Berlin) ausgeführt, in der sowohl die Normaltemperatur (32° C) als auch die Schocktemperatur (4,5° C) auf ± 0,1° C eingestellt werden konnte. Als Lichtquelle dienten 4 HPL-Lampen Philips 250 W Typ 57220 G/97 für die Erzeugung von Weiß- bzw. Blaulicht und 2 Lampen Philips 500 W Typ 13104 G/99 für Rotlicht. Die eingestrahlte Lichtenergie beim Farblicht (Filter der Fa. SCHOTT) wurde mit einem Ergmeter der Fa. YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS gemessen und betrug aus technischen Gründen nur etwa 0,9 x 10^4 erg/ Sek x cm^2, was etwa der Hälfte der Lichtenergie im normalen Lichtthermostaten (Weißlicht 1,7 x 10^4 erg/ Sek x cm^2) entspricht. Eine Kontrolle bei 32° C ergab für Rot- und Blaulicht gleiche Chlorophyllwerte.

METHODEN

1. Zellzahl

Zellzählungen wurden im Hämacytometer nach Thoma (neu) durchgeführt.

2. Kohlenhydrate

Der Kohlenhydratgehalt wurde mit der Anthronmethode nach ROE (1955) bestimmt. Die Messung erfolgte photometrisch bei 620 nm im Zeiss-Spektralphotometer PMQ 2.

3. Protein

Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs diente die Mikrokjeldahlmethode. Durch Titration mit n/200 H_2SO_4 und Umrechnung auf Stickstoff kann der Gesamtproteingehalt (Faktor 6,25) ermittelt werden.

4. Trockengewicht

Die einmal in Aqua dest. gewaschenen Algen wurden in Aluminiumtiegeln oder in Glaszentrifugengläsern bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, im Exsiccator abgekühlt und gewogen.

5. Pigmente

Die Gesamtpigmente wurden 30 Min lang mit 96 % Methanol bei 60° C aus den Algen extrahiert. Die Gesamtchlorophyllmenge berechnet sich nach Messung im Zeiss-Spektralphotometer PMQ 2 bei 650 nm und 665 nm nach der Gleichung:

mg Chlorophyll = $2{,}55 \times 10^{-2} \times E_{650} + 0{,}4 \times 10^{-2} \times E_{665}$ (MACKINNEY 1941).

Zur genaueren Analyse der einzelnen Pigmentmengen eignet sich durch ihre große Trennschärfe die von HAGER und BERTENRATH (1962) beschriebene Methode der Auftrennung und quantitativen Bestimmung von Plastidenfarbstoffen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Zur Herstellung der Platten diente ein Gemisch aus:

36 g Kieselgur G für DSC nach STAHL, Merck 8129
9 g Kieselgel "unter 0,8 mm"für DSC, Merck 7729

9 g $CaCO_3$, praecipitatum p.a. Merck 2066
0,054 g $Ca(OH)_2$ p.a. Merck 2110
150 ml wäßrige Ascorbinsäure 8 x 10^{-3} M Merck 50074.
Die Mischung wurde als 0,3 mm starke Schicht mit einem Beschichtungsgerät der Fa. DESAGA, Heidelberg auf Glasplatten (20 x 20 cm) aufgetragen. Nach Trocknung bei 50° C müssen die Platten baldmöglichst verwendet werden, da die Wirksamkeit der Ascorbinsäure als Oxidationsschutz für die Pigmente nach kurzer Zeit nachzulassen beginnt (HAGER und MEYER-BERTENRATH 1966, RUDOLPH und BUKATSCH 1967). Als Farbstoffextrakt wurde ein 96%iger Methanolauszug verwendet (vgl. Chlorophyllbestimmung). Als Laufmittel diente ein Gemisch aus 200 ml Petrolbenzin (Kp. 100 - 140° C), 20 ml Isopropanol und 0,5 ml Aqua dest.
Die Auftrennung erfolgte aufsteigend nach dem Prinzip der Verteilungschromatographie, bei der die relative Lage der einzelnen Pigmente zueinander ihrer verschiedenen Löslichkeit in dem verwendeten Flußmittel und nicht ihrem Absorptionsverhalten entspricht. Nach etwa 45 Min war die Trennung abgeschlossen. Es konnten 7 Farbstoffzonen unterschieden werden, die durch Analyse der Absorptionsspektren in Anlehnung an LEDERBOGEN (1964) und HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966) als
Carotin
Chlorophyll a
Chlorophyll b
Lutein
Lutein 5,6 epoxid
Violaxanthin und
Neoxanthin
identifiziert wurden.
Die einzelnen Bereiche wurden in noch feuchtem Zustand aus den Platten herausgekratzt und sofort in ihre speziellen Lösungsmittel überführt. Schnelles Arbeiten bei schwachem Licht ist notwendig, da sich alle Farbstoffe losgelöst von ihrer natürlichen Trägersubstanz schnell verändern. Die quantitative Bestimmung erfolgte photometrisch im PMQ 2. Tab. 1 gibt Aufschluß über Lösungsmittel, Absorptionsmaxima und spezifische Extinktionskoeffizienten.

Tab. 1

Lösungsmittel, Absorptionsmaxima und spezifische Extinktions-Koeffizienten für die quantitative Pigmentbestimmung

Pigment	Elutions-mittel	Absorptions-maxima	spezi-fische Extink-tions-Koeffi-zienten	Literatur
Chl a	80 % Aceton	663 nm	84	MACKINNEY 1940
Chl b	80 % Aceton	645 nm	52	MACKINNEY 1940
Car	Hexan	450 nm	258	ZSCHEILE et al. 1942
Ges.X	Aethanol absol.	443 nm	246	LEDER-BOGEN 1964

Carotin, bei Chlorella als α- und β-Carotin nachgewiesen (HAGER und MEYER-BERTENRATH 1966), kann mit dieser Methode nicht weiter aufgetrennt werden. Die einzelnen Zonen der Xanthophylle (oxidierte Carotinoide) waren insbesondere bei der Schock-Kultur so dünn und eng zusammenliegend, daß sie in der Regel nur zusammen als "Gesamtxanthophyll" eluiert wurden. Verschiebungen innerhalb dieser Pigmentgruppe in Abhängigkeit von der Belichtung (BLASS et al. 1959, HAGER 1967, 1975) oder mögliche intramolekulare Umwandlungen von der trans- in die cis-Konfiguration (HAGER 1970), die ebenfalls zu Verschiebungen von Maxima führen, konnten deshalb nicht berücksichtigt werden. Die für die Einzelxanthophylle gefundenen Maxima lagen in Übereinstimmung mit Literaturangaben (GOODWIN 1955) zwischen 440 nm und 445 nm. Für die Gesamtxanthophylle wurde ein Absorptionsmaximum bei 443 nm und ein spezifischer Koeffizient von 246 berechnet, die sich aus den prozentualen Anteilen der einzelnen Pigmente am Gesamtxanthophyll ergaben.

Insbesondere mit zunehmender Schockwirkung traten bei den Chlorophyllen graugrüne Vor- und Nachzonen auf, die nach

HAGER (1957 a, 1957 b) Peroxidbildungen der Chlorophylle bzw. Chlorophyllide darstellen. Diese wurden mit den Chlorophyllhauptzonen eluiert und jeweils zusammen photometrisch bestimmt.

6. Lipide

Die Extraktion der Gesamtlipide erfolgte nach der Methode von BLIGH und DYER (1959) in einem Gemisch von $CHCl_3$: CH_3OH, die Trennung der polaren Lipide untereinander wie auch insgesamt von den apolaren Lipiden (= Neutralfette und freie Fettsäuren) durch Dünnschichtchromatographie (HEISE 1972).
Nach Hydrolyse der Lipide wurden die Fettsäuren methyliert (POHL, GLASL und WAGNER 1970), gaschromatisch getrennt und durch Integration und Vergleich mit quantitativen Reinsubstanzen erfaßt (HEISE 1972).

7. Photosynthese - Atmung

Die Sauerstoffproduktion im Licht sowie der Verbrauch im Dunkel wurden polarographisch mit einer Clark-Elektrode bestimmt. Angeschlossen war ein Oxygenmonitor der Fa. YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS, die Aufzeichnung erfolgte mit einem Schreiber Typ Servogor der Fa. KIPP und ZONEN. Das Gerät wurde mit luftgesättigtem Wasser geeicht.
Die Messung des Gasstoffwechsels der Algen wurde direkt im mineralischen Medium in einer Plexiglaskuvette mit Wassermantel und angeschlossenem Thermostaten bei 32° C vorgenommen; für gleichmäßige Verteilung sorgte ein Magnetrührer. Als Lichtquelle diente eine Halogen-Reflektor-Lampe Phillips 64230 B, 15 V, 150 W. Die maximale Lichtenergie betrug 1,6 x 10^6 erg/Sek x cm^2; Energieabstufungen waren durch Verwendung von Graufiltern der Fa. BALZER möglich.
Die Werte der apparenten Photosynthese wurden z.T. mit dem O_2-Verbrauch bei anschließender Verdunklung (Dunkelatmung) korrigiert und auf Chlorophyll, die Dunkelatmung selbst auf Protein bezogen.

8. Absorptionsspektren

Absorptionsspektren bei Zimmertemperatur von Gesamtpigmentextrakten und Algensuspensionen wurden im Spektralphotometer

UNICAM aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte nach Normalisierung der Kurven: Absorption 720 nm = 0, Absorption 665 nm = 100.

9. Tieftemperatur-Absorptionsspektren

Die Tieftemperatur-Absorptionsspektren wurden nach SHIBATA (1959) in einem Doppelstrahlphotometer MPS-50L (Fa. SHIMADSU) aufgezeichnet. Zur Verbesserung der Qualität der Spektren wurden die Algen durch Schütteln mit Glasperlen in der Vibrogen-Zellmühle Vi 2 (Fa. BÜHLER) zertrümmert und die abgenutschte Fraktion in einer speziellen Plexiglasküvette von 1 mm oder 2 mm Schichtdicke durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schnell eingefroren. Die Auswertung der Absorptionsspektren erfolgte nach Normalisierung, wobei die Absorption bei 720 nm = 0, die Absorption bei 678 nm = 100 gesetzt wurde.

10. Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektren (77° K)

Die Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektren wurden in Anlehnung an HARNISCHFEGER (1974 b) in einem Fluorometer nach BUTLER aufgenommen. Eine Probe der Algensuspension wurde in eine doppelte Lage Mullstoff aufgesogen, in einen Doppelring aus Hartgummi gespannt und schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gemessen wurde in einem Dewargefäß mit Glasboden (vgl. CHO, SPENCER and GOVINDJEE 1966). Die Anregung erfolgte mit zwei 150 W Wolfram-Halogen-Lampen (Philips 6432) mit vorgeschaltetem Interferenzfilter 642 nm (SCHOTT DIL). Die gemessenen Signale wurden korrigiert und die Spektren normalisiert auf $F_{722} = 100$, $F_{690} = 0$. Weitere technische Einzelheiten s. HARNISCHFEGER (1974 b).

11. Fluoreszenz-Anregungsspektren bei Raumtemperatur

Die Fluoreszenz-Anregungsspektren der Algensuspensionen wurden im SHIMADSU-Doppelstrahlspektralphotometer MPS-50L mit entsprechenden Zusatzgeräten bei Raumtemperatur gemessen. Bei dieser Methode arbeitet man mit einer konstanten Wellenlänge (im Maximum bei 684 nm) und verfolgt, wie sich die Fluoreszenzemissionsrate als Funktion der Wellenlänge des anregenden Lichtes verändert. In dem verwendeten Bereich

der Anregung zwischen 400 und 500 nm stammt das Absorptionsmaximum bei 435 nm vom Chl a, das Absorptionsmaximum bei 470 nm vom Chl b. Aus dem Verhältnis der Raten der Fluoreszenzemission (684 nm) als Folge der Absorption bei 435 nm und 470 nm kann man somit sowohl auf das Verhältnis Chl a / Chl b als auch auf die Fähigkeit des Systems schließen, Energie von den Kollektorpigmenten an das photosynthetisch aktive Chlorophyll des PS II abzugeben.
Die Schichtdicke betrug 1 cm, zur Auswertung wurden die Kurven normalisiert, indem die Fluoreszenz $F_{470 \rightarrow 684} = 100$, die Fluoreszenz $F_{550 \rightarrow 684} = 0$ gesetzt wurden.

12. Messung der Aktivität der Photosysteme an Partikeln

In Vorversuchen wurden drei Partikelpräparationen (BERZBORN und BISHOP 1972, GRIMME and BOARDMAN 1972 sowie MELL 1974) und die Permeabilitätserhöhung an ganzen Zellen durch Zugabe von Glutaraldehyd (HALLIER and PARK 1969) bzw. Acrolein miteinander verglichen. Tab. 2 gibt die PS I / PS II Aktivitäten nach verschiedener Vorbehandlung wieder.

Tab. 2

PS I- bzw. PS II-Aktivitäten nach verschiedenen Vorbehandlungen in µm e^- /mg Chl x Std

Methode	$H_2O \rightarrow$ DCPIP			DPC → DCPIP			Asc/DCPIP → MV	
	-DCMU	+DCMU	Korr.	-DCMU	+DCMU	Korr.		Blindlauf
BERZBORN und BISHOP	21,0	0	21,0	52,5	31	21,5	552	-
GRIMME und BOARDMAN	0	0	0	353	336	17	826	-
MELL	14,1	0	14,1	38,8	21,2	17,6	1072	++
HALLIER und PARK:								
Glutaraldehyd	8,25	12,5	--	3,3	1,3	2	312	+
Acrolein	0	10	--	30	26	4	676	+

Die besten Raten für PS II ergaben sich bei dem Aufschluß nach BERZBORN und BISHOP mit H_2O als Donator. Die Raten werden zwar durch Zugabe des starken Elektronendonators DPC (VERNON and SHAW 1969, HARNISCHFEGER 1974a) gesteigert, gleichzeitig wird aber die Reaktion mit DCMU nur teilweise gehemmt, sodaß eine Korrektur durchgeführt werden muß. Dies entspricht den Ergebnissen von GRIMME und BOARDMAN (1972), die bei Zugabe von DPC eine 25%ige Resistenz der PS II-Aktivität gegen DCMU registrierten. Auch für die Untersuchungen der PS I-Aktivität war die Methode von BERZBORN und BISHOP am günstigsten. Höhere Raten bei anderer Vorbehandlung waren meist mit einem starken Blindlauf verbunden.
Für alle weiteren Versuche wurde die Präparation nach BERZBORN und BISHOP verwendet: Die abzentrifugierten Algen werden in einem Puffer der Zusammensetzung
20 mM Tricin pH 7,5
10 mM KCl
0,05 mM EDTA
0,5 mM Dithiothreitol
und mit Glaskugeln (0,35 mm) in Stahlbechern von 12 ml Vol. in der Vibrogen-Zellmühle Vi 2 (Fa. BÜHLER) mit angeschlossenem Kühlsystem geschüttelt. Als Aufbruchzeit, die in der Literatur zwischen 15 Sek (GRIMME and BOARDMAN 1972) und 30 Min (GRAHAM and SMILLIE 1971) angegeben ist, erwiesen sich 90 Sek als günstig (vgl. Tab. 3).

Tab. 3

PS I-/ PS II-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Aufbruchzeit in $\mu m\ e^-/mg$ Chl x Std

Aufbruchzeit	H_2O → DCPIP		DPC → DCPIP		
	- DCMU	+ DCMU	- DCMU	+ DCMU	Korr.
30 Sek	19,6	0	60,6	37	23,6
60 Sek	20,8	0	64	41,5	22,5
90 Sek	23,8	0	69,3	45,5	23,8
180 Sek	14,5	0	40	39	1
300 Sek	10,2	0	35	33,9	1,1

Von Bedeutung ist die Tatsache, daß das Aufschlußmedium im Gegensatz zu den übrigen Lösungen keine Saccharose enthalten darf (vgl. KOK and DATKO 1965).
Die Chloroplastenbruchstücke werden mit 15 ml Puffer der Zusammensetzung
20 mM Tricin pH 7,5
10 mM KCL
0,48 M Saccharose
mit Hilfe einer Glasfritte von den Glaskugeln getrennt und zur Abtrennung größere Bruchstücke 5 Min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend 15 Min bei 20000 g zentrifugiert. Dieser Schritt muß in durchsichtigen Zentrifugenbechern erfolgen, denn dabei entsteht ein dreischichtiges Pellet: über einer hellgrünen Schicht und einer weißen Stärkeschicht liegt eine dicke, dunkelgrüne Schicht und nur diese wird vorsichtig mit ca. 3 ml einer Lösung von
30 mM KCL
1 % BSA
0,4 M Saccharose in Aqua bidest. abgewaschen. Die so gewonnene Suspension wird für beide PS-Tests verwendet. Die gesamte Präparation erfolgte bei 0° - 4° C. Tab. 4 gibt den Chlorophyllgehalt der einzelnen Fraktionen wieder.

Tab. 4

Chlorophyllgehalt einzelner Fraktionen der Partikelpräparation

Fraktion	Chlorophyll (µg)	Chlorophyll (%)
Ganze Zellen	4925	100
Partikel	3340	68
Pellet 100 g	630	13
Überstand	2710	55
Pellet 20000 g		
- obere Schicht (Test)	2080	42
- untere Schicht	520	10
Überstand	109	2

Fluoreszenz-Emissionsspektren bei 77° K von Partikeln aus Normal-Algen (24. Std) zeigen den typischen Verlauf mit einem Hauptmaximum bei 722 nm (vgl. u.a. GRIMME and BOARDMAN 1972, GOVINDJEE 1972), wie man ihn auch für ganze Algen erhält (vgl. Kp. II, 6.). Bei Partikeln aus kältegeschockten Algen ergibt sich eine Verschiebung im Spektrum und eine Ausbildung von 3 Maxima (Abb. 2).

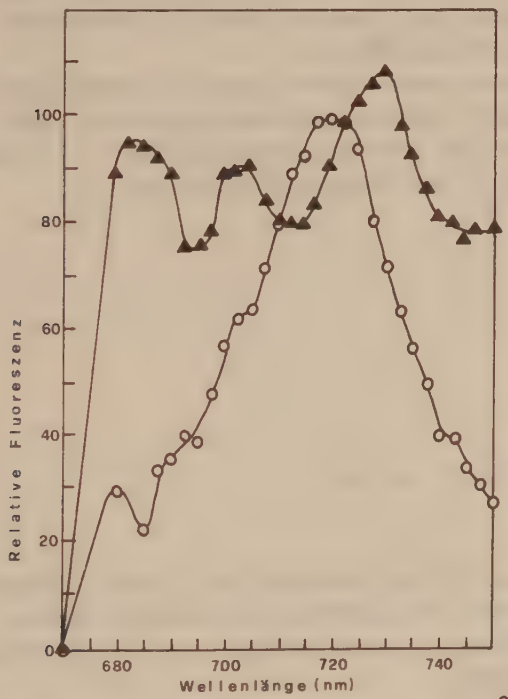

Abb. 2: Fluoreszenz-Emissionsspektren bei 77°K von Partikeln aus Chlorella-Zellen einer Synchronkultur (24.Std) o——o und einer kältegeschockten Kultur (24.Std) ▲——▲. Die Kurven wurden normalisiert: $F_{722} = 100, F_{670} = 0$.

Die PS Tests:

1. PS I

Der Testansatz für PS I enthielt als Donator DCPI das durch den Überschuß an Ascorbat reduziert gehalte: ird

(JACOBI 1974) und als Akzeptor Methylviologen (MV). Reduziertes DCPIP ist Donator für Cytochrom f, das in den Thylakoidmembranen fest gebunden ist und dem Reaktionszentrum von PS I (P 700) vorgeschaltet ist. MV entnimmt zwischen dem primären Elektronenakzeptor des PS I und dem Ferredoxin Elektronen aus dem System und wird dabei zu seinem farblosen Semichinon reduziert. Der Elektronentransport $DCPIPH_2$ - MV kann als O_2-Aufnahme polarographisch gemessen werden; pro 2 Elektronen, die durch PS I laufen, wird 1 O_2 verbraucht (STROTMANN und VON GÖSSELN 1972).
Der Sauerstoffverbrauch wurde 10 Min lang mit einer Clark-Elektrode der Fa. RANK BROTHERS BOTTISHAM gemessen. Dabei wurde Rotlicht (> 620 nm) mit einer Energie von 5×10^5 erg/Sek x cm^2 eingestrahlt. Der Testansatz enthielt:

$MgCl_2$	$3{,}3 \times 10^{-3}$ M
NH_4Cl	10^{-2} M
KCN	10^{-3} M
DCMU	6×10^{-4} M
DCPIP	10^{-4} M
Asc	7×10^{-3} M
MV	5×10^{-4} M
Extrakt	200 µl
TES Puffer	0,02 M pH 7 ad 3 ml.

2. PS II

Aus bereits erwähnten Gründen wurde für PS II als Elektronendonator Wasser und nicht DPC gewählt. Als Akzeptor diente DCPIP, das bei Reduktion in seine farblose Leucobase übergeht. Der Testansatz enthielt:

$MgCl_2$	$3{,}3 \times 10^{-3}$ M
NH_4Cl	10^{-2} M
DCPIP	10^{-4} M
Extrakt	200 µl
TES Puffer	0,02 M pH 7 ad 3 ml.

Der Parallelen war 6×10^{-4} M DCMU zugesetzt.

Gemessen wurde die Extinktionsänderung von DCPIP bei 600 nm vor und nach Belichtung. Der Extinktionskoeffizient von DCPIP bei pH 7,0 beträgt 20×10^3 (ARMSTRONG 1964). Als Lichtquelle

diente eine Lampe Philips Altrilux 13104 G99 500 W mit einem Rotfilter > 620 nm und einem Wärmeschutzfilter KG1 (SCHOTT). Die eingestrahlte Energie betrug 2 x 10^5 erg/ Sek x cm^2 (Ergmeter der Fa. YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS).

ERGEBNISSE

I. Die Bedeutung der äußeren Bedingungen für das Ausbleichen der Algen

1. Die Lage der empfindlichen Phase

Durch die früheren Arbeiten von LORENZEN und RUPPEL (1958), PIRSON, LORENZEN und KOEPPER (1959) sowie LORENZEN (1963) sind die Versuchsbedingungen zur Überprüfung der genauen Lage der größten Kälteempfindlichkeit im Synchronzyklus von Chlorella bereits vorgegeben (Abb. 3). Die Normalkultur

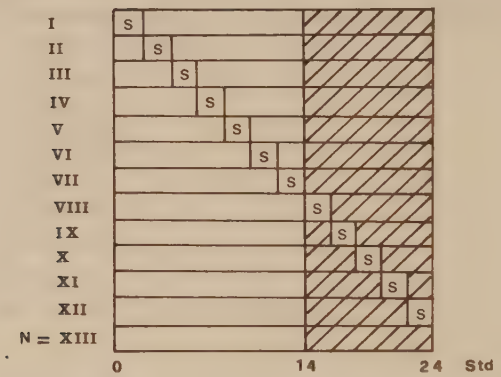

Abb. 3: Schema der Versuchsanordnung zum Test der Kälteempfindlichkeit (Schockdauer 2 Std).

□ 32°C, Licht
▨ 32°C, Dunkel
[S] 4,5°C, Licht

(N = XIII) wächst während des gesamten LDW 14:10 bei 32° C; 12 weitere Kulturen (I - XII) werden zu verschiedenen Zeiten zwei Std lang 4,5° C bei sonst unveränderten Bedingungen ausgesetzt.

Da ein Ausbleichen der Algen als erstes auffällt, wurde zunächst der Gehalt an Gesamtchlorophyll nach 24 Std als Kriterium für die Auswirkungen und Folgen der Kälteapplikation verwendet.

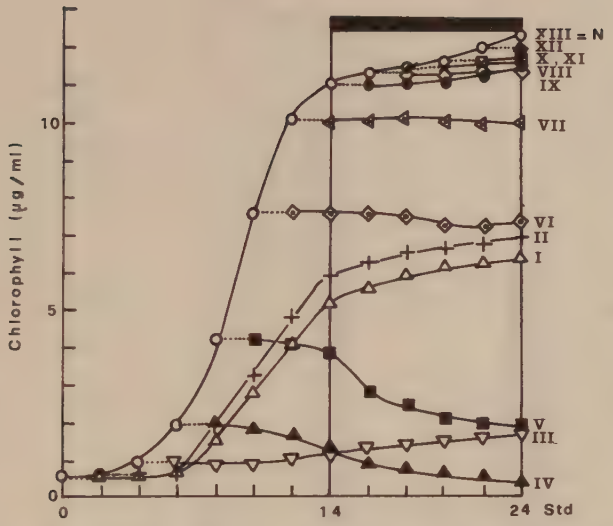

Abb. 4: Chlorophyllgehalt von Chlorellakulturen nach Kälteschock (2 Std 4,5°C, Versuchsbedingungen s. Abb. 3).

Die Veränderungen des Chlorophyllgehaltes sind für alle 13 Proben in Abb. 4 dargestellt. Von dem Normalbild weichen am deutlichsten die in der Mitte der Lichtzeit kältegeschockten (Proben (III, IV, V) ab. In Kultur IV nimmt das Chlorophyll bereits kurz nach der Behandlung ab. Diese Abnahme setzt sich in der Dunkelzeit langsamer fort und führt am Ende des Zyklus zu einem Minimalwert. Diese Kultur erscheint nach 24 Std mit dem bloßen Auge weiß.

Trägt man alle 13 Werte für das Gesamtchlorophyll nach 24 Std auf, so erkennt man eine deutlich empfindliche Phase im Bereich der 5. bis 10. Std mit der größten Empfindlichkeit in der 7. und 8. Std (Kultur IV) des Entwicklungszyklus der Algen (Abb. 5). Die Sensibilität nimmt unter den gewählten Versuchsbedingungen mit zunehmendem Alter der Zellen ab und ist während der Dunkelzeit nur noch ganz schwach ausgeprägt.

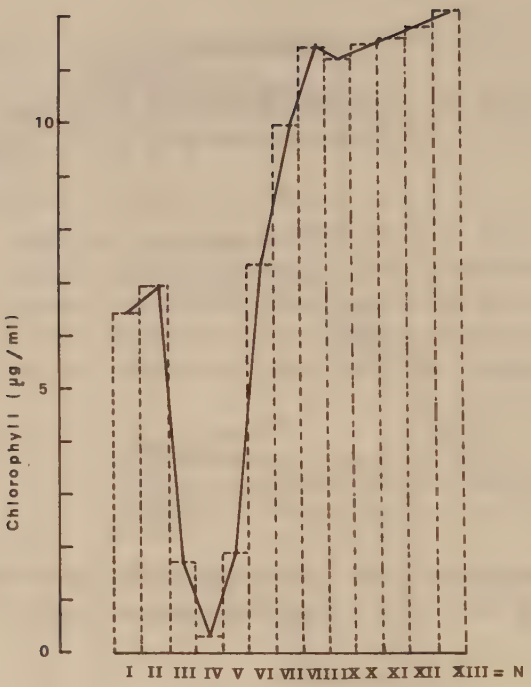

Abb. 5: Kälteresistenz im Verlauf des Synchronzyklus von Chlorella. Dargestellt ist der Chlorophyllgehalt am Ende des Zyklus (Kälteschock 2 Std 4,5°C, Versuchsanordnung s. Abb. 3).

SOROKIN (1961) fand bei synchronen Chlorellen eine ähnliche entwicklungsbedingte Empfindlichkeit gegen Starklicht, die vom Beginn des Zyklus bis zur 8. Std zunahm. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang.
Eine Zunahme der Empfindlichkeit bis zur 8. Std und die anschließend steigende Resistenz gegen den Kälteschock ist auch aus dem Vergleich der Spektren der Gesamtpigmentextrakte in Methanol aller 13 Kulturen zu erkennen (Abb. 6). Neben der Bestätigung der empfindlichen Phase (5. - 10. Std) bringt dieser Vergleich eine weitere Erkenntnis: Die Spektren von Kultur IV (7. und 8. Std) und V (9. und 10. Std) lassen eine

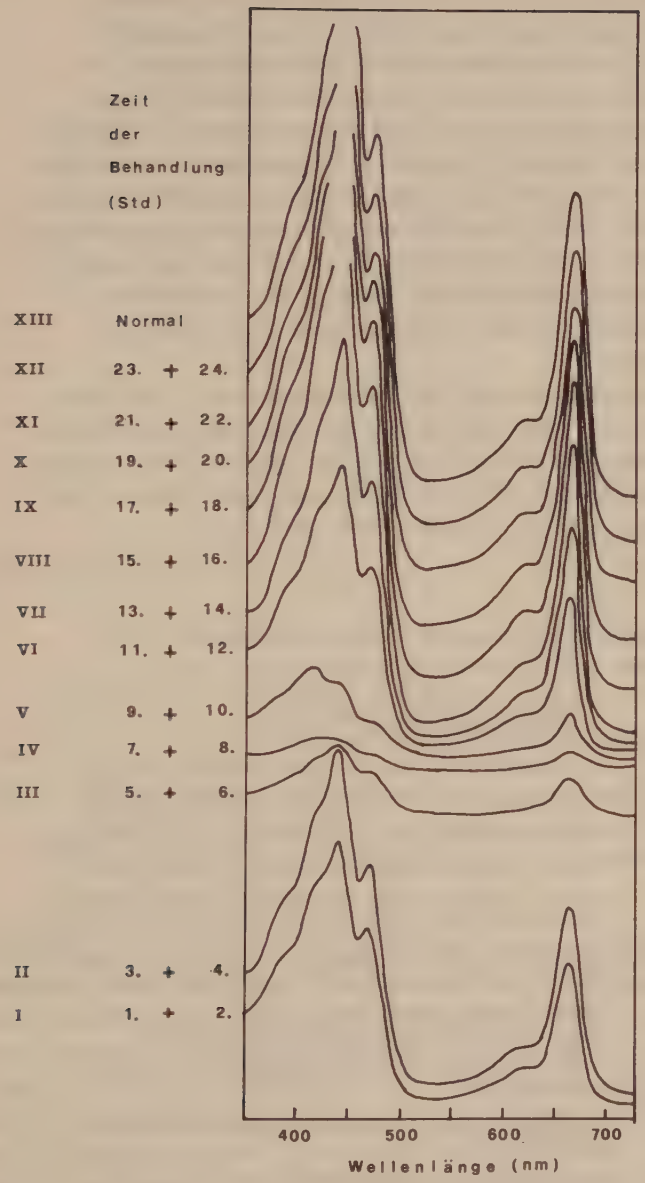

Abb. 6: Absorptionsspektren des Pigmentextraktes aus Chlorellakulturen nach Kälteschock (2 Std 4,5°C, Versuchsanordnung s. Abb. 3).

deutliche Verschiebung von Absorptionsmaximum und Schulter im blauen Bereich des Spektrums (410 - 440 nm) erkennen: Die ursprüngliche Schulter bei 410 nm wird zum Maximum, das Maximum bei 440 nm zur Schulter. Diese Verschiebung, die ihre Ursache möglicherweise in einer Veränderung des Verhältnisses Chl a / Chl b hat, tritt nur im Zusammenhang mit einem starken Abbau der Pigmente auf. Vergleichbare Spektren fanden KANDLER und SCHÖTZ (1956) bei Chlorophyllzerstörung in carotinfreien Mutanten von Purpurbakterien in Licht und Sauerstoff und auch MARVIN III und KARLANDER (1974), die den Bleicheffekt bei Chlorella während langfristiger Inkubation in 10° C untersuchten.
Zur weiteren Charakterisierung der Schockwirkung in der empfindlichen Phase der Algen soll die Untersuchung der Zellentwicklung dienen. Der Schock hat in der empfindlichen Phase auf das Zellwachstum und die Zellvermehrung eine ebenso tiefgreifende Wirkung, wie auf die Pigmente (Tab. 5).

Tab. 5

Zellzahl und Charakterisierung von Chlorellakulturen nach Kälteschock (2 Std 4,5° C, Versuchsanordnung s. Abb. 3)

Kultur	ZZ	Charakterisierung
I	1450	vollsynchron, Freisetzung termingerecht
II	1350	vollsynchron, Freisetzung termingerecht
III	135	wenige Autosporen, übrige Zellen mittelgroß
IV	105	keine Freisetzungen, Zellen klein, weiß
V	105	keine Freisetzung, Zellen unterschiedlich groß und unterschiedlich stark ausgebleicht
VI	170	teilweise Freisetzung, verzögert, übrige Zellen größer als in V, ± gleich groß und grün
VII	920	Freisetzung verzögert, nicht synchron, ungeteilte Zellen größer als in VI
VIII	2100	vollsynchron, Freisetzungszeit leicht verlängert
IX	2060	vollsynchron, Freisetzungszeit leicht verlängert
X	2040	vollsynchron, Freisetzungszeit leicht verlängert
XI	2080	vollsynchron, Freisetzung manchmal beschleunigt
XII	2100	vollsynchron
XIII	2120	vollsynchron

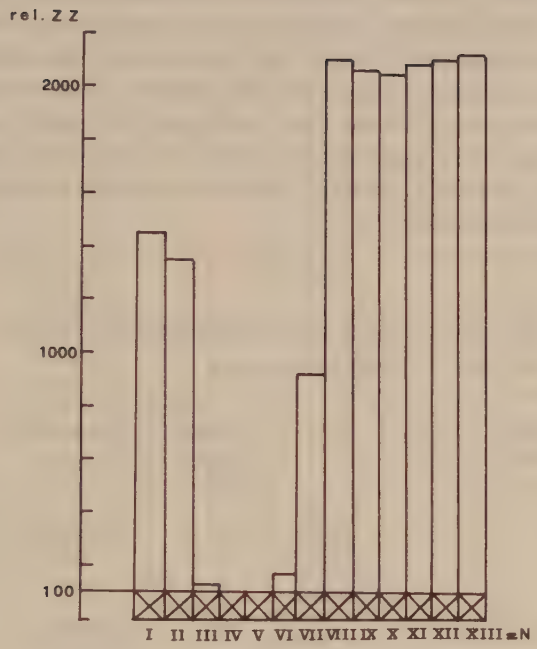

Abb. 7: Kälteresistenz im Verlauf des Synchronzyklus von Chlorella;dargestellt sind die rel. ZZ am Ende des Zyklus (Kälteschock 2 Std 4,5°C,Versuchsanordnung s.Abb. 3).

Kulturen, die zu Beginn des Zyklus der tiefen Temperatur ausgesetzt wurden, haben termingerechte Autosporenfreisetzung aber deutlich geringere Autosporenzahlen als die unbehandelte Normalkultur. Die kritische Phase liegt in der 7. und 8. Std (Abb. 7): wird der Kälteschock in dieser Zeit angewendet, so bleiben die Zellen klein - die Größe ändert sich vom Beginn des Schocks bis zur 24. Std nicht merklich - und eine Zellvermehrung unterbleibt. Im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium stellen die Algen ihr Wachstum nur während der Kältebehandlung selbst ein. Gibt man den Kälteschock zu Beginn der Autosporen-Freisetzung (XI), so kann diese beschleunigt werden.

Von einer ähnlichen sensiblen Phase bei Chlorella ellipsoidea berichtete LORENZEN (1963); es erschien deshalb wichtig zu prüfen, ob auch andere grüne Einzeller eine kälteempfindliche Phase besitzen. Voraussetzung für derartige Vergleiche ist natürlich die Synchronisierbarkeit der Organismen. Es wurden vier einzellige Grünalgen ausgesucht und durch LDW synchronisiert. Scenedesmus acutus wurde zum damaligen Zeitpunkt im LDW 10:8 synchronisiert, inzwischen erwies sich ein LDW 10:12 als günstiger. In Tab. 6 sind die Organismen und die Bedingungen ihrer Kultur aufgeführt.

Tab. 6

Organismen, die zur Suche einer kälteempfindlichen Phase benutzt wurden und ihre Kulturbedingungen

Objekt	Temperatur	LDW	NL	Vermehrungsrate	Literatur
Chlamydomonas reinhardii 11-32/89	35° C	12:12	KUHL (1962) RUPPEL (1962)	10	SCHLÖSSER (1962)
Scenedesmus obliquus 276-6/03	30° C	12:12	"	15	SENGER (1970 a)
Ankistrodesmus braunii 202-7c	30° C	12:12	"	11	DOMANSKI-KADEN und SIMONIS (1972)
Scenedesmus acutus Tomaselli	30° C	10:8	"	10	GALLING et al. (1975)

Bei Anwendung von zwei- oder dreistündigen Kälteschocks (Bedingungen wie in Abb. 3) fand sich bei allen vier Algen eine empfindliche Phase in der Mitte der Lichtzeit (Abb. 8). Scenedesmus obliquus weist selbst bei dreistündigen Kältebehandlungen noch eine hohe Resistenz auf, Chlamydomonas und Ankistrodesmus sind zusätzlich zu Beginn der Lichtzeit sehr empfindlich.

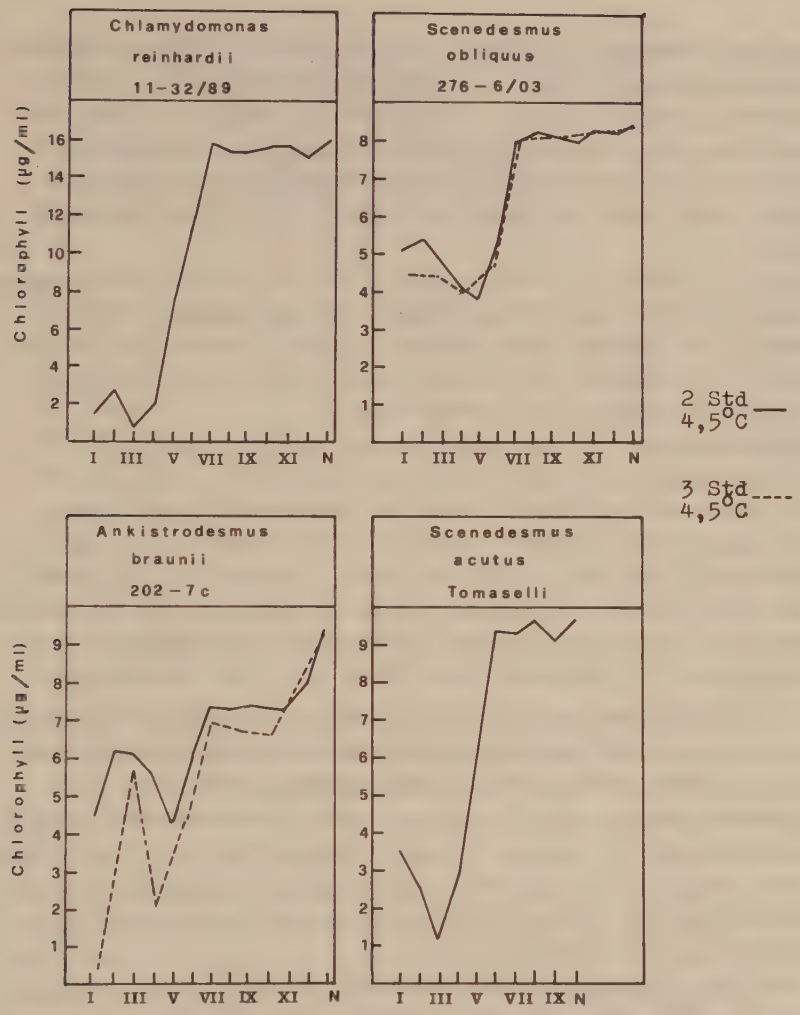

Abb. 8: Kälteresistenz im Verlauf des Synchronzyklus von 4 Grünalgen. Versuchsanordnung und Auswertung s. Abb. 3 und 5.

Das Phänomen einer kälteempfindlichen Entwicklungsphase findet sich aber nicht nur bei den erwähnten Grünalgen. Ähnliche entwicklungsbedingte Schwankungen in der Empfindlichkeit gegenüber tiefen Temperaturen wurden auch für Prokaryoten wie Bacillus subtilis (SATO and TAKAHASHI 1968 b) oder Chromobacterium violaceum (EFTHIMION and CORPE 1969) beschrieben.

Nachdem Vorkommen und Lage einer maximalen Kälteempfindlichkeit im Entwicklungszyklus von Chlorella und anderer synchronisierter grüner Einzeller festgestellt wurden, schließt sich die Frage an, inwieweit die Synchronisationsbedingungen, etwa der LDW oder die Verdünnung, dafür mitverantwortlich sind. Eine Reihe von Zusatzversuchen soll darüber Auskunft geben.

Setzt man nichtsynchrone Kulturen 2 - 3stündigen Kälteschocks aus, so findet man einige Stunden später ebenfalls einen Anteil von kleinen ausgebleichten Zellen, woraus zu ersehen ist, daß nicht der LDW allein diese Sensibilität hervorgerufen haben kann (vgl. PIRSON 1962).

Verzichtet man bei synchronisierten Algen innerhalb der 24 Zyklusstunden auf eine Verdunklung, so erhöht sich die Sensibilität und verlängert sich die kritische Phase. Dieser Übergang zu DL verstärkt also den Kälteeffekt und bringt im Extremfall die Zellen zum Absterben. Variationen der Länge des Kälteschocks zeigen, daß unter DL schon 90 Min zum völligen späteren Ausbleichen führen. Das Maximum der Empfindlichkeit wird durch DL nicht verändert, wohl aber ihre Ausdehnung.

Schließlich kann man auch in einer durch einmalige Verdünnung innerhalb 24 Std synchron erhaltenen DL-Kultur (RUPPEL 1962) eine wachstumsabhängige Kälteempfindlichkeit feststellen (LORENZEN 1963), die allerdings wegen der geringeren Synchronisationsschärfe weniger intensiv ausgeprägt ist. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß der Entwicklungszustand der Zellen für die Empfindlichkeit verantwortlich ist und nicht spezielle Bedingungen des LDW.

Parallele Kälteschocks bei Kulturen mit veränderter relativer ZZ (50, 200) bringen keine bedeutenden Veränderungen in der Lage der Sensibilität. Auch nach einer Verdünnung der Kulturen auf eine gleiche optische Dichte unmittelbar vor der Kältezeit tritt das Maximum des Ausbleichens zur bekannten kritischen Zeit auf. Damit ist auch ausgeschlossen, daß der verringerte Lichtgenuß der Einzelzelle, der aus der zunehmenden optischen Dichte während des Wachstums der Kultur resultiert, der Grund für die Abnahme der Sensibilität nach der 8. Std ist.

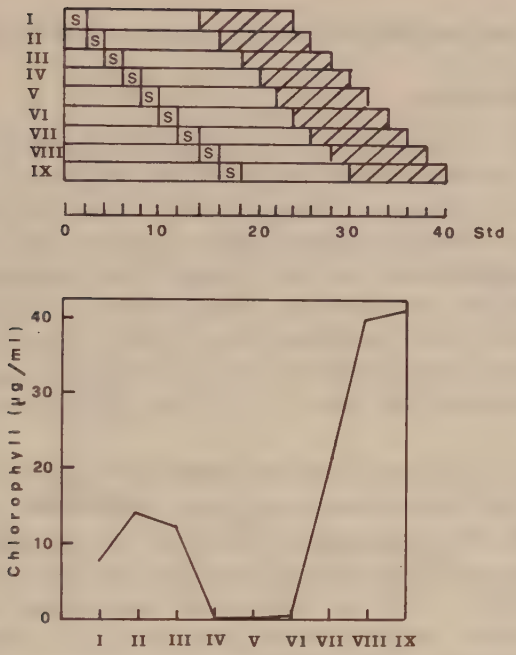

Abb. 9: Kälteresistenz bei einheitlicher Belichtungszeit (12 Std) nach dem Kälteschock (2 Std 4,5°C). Oben: Versuchsanordnung. Unten: Chlorophyllgehalt am Versuchsende.

In Abwandlung des Standardversuches (vgl. Abb. 3) wurden nun alle Kulturen nach dem Kälteschock gleich lang belichtet. Versuchsbedingungen und Ergebnis sind in Abb. 9 wiedergegeben. Die kritische Phase bleibt auch jetzt im Bereich der 7. und 8. Std, ist aber darüber hinaus noch stark ausgeweitet. Die Chlorophyllwerte der Kulturen II und III liegen (wie auch die der Kulturen VII ff) wegen der verlängerten Lichtzeit nach dem Schock bedeutend höher als im Standardversuch (Abb. 5). Anders reagieren die Kulturen V und VI. Sie bleichen im Gegensatz zum Standardversuch unter diesen Bedingungen auch ganz aus, die empfindliche Phase verlängert sich also über den ursprünglich ermittelten Zeitraum hinaus. Somit wurde nachgewiesen, daß sowohl die Versuchsbedingungen während der kritischen Zeit als auch die

danach für das Ausbleichen der Zellen verantwortlich sind.

2. Die Schocktemperatur

In den bisherigen Versuchen wurde die Schocktemperatur von 4,5° C aus den vorangegangenen Arbeiten übernommen (s. S. 16). Um zu entscheiden, ob andere Temperaturen, in der kritischen Zeit appliziert, ebenfalls Schädigungen von Chlorophyllhaushalt und Zellwachstum bewirken, wurden Parallelversuche mit unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Die Ergebnisse von LORENZEN (1963) konnten dabei im wesentlichen bestätigt werden. Die Intensität der Schockwirkungen nimmt mit abnehmender Temperatur bis etwa 4 - 5° C zu und bleibt dann unverändert.
Erniedrigt man zur üblichen Zeit die Temperatur für 2 Std auf 20° C, so setzt die Freisetzung etwas später ein, die Schubhöhe und der Chlorophyllgehalt bleiben jedoch gegenüber der unbehandelten Kontrolle nahezu unverändert. Bei einer Erniedrigung auf 10° C ist der Beginn der Freisetzung um etwa 4 Std verzögert und ihre Dauer auf rund 3 Std verlängert; außerdem sind Autosporenzahl (1400) und Chlorophyllgehalt erniedrigt. Ein zweistündiger Schock mit 7° C verzögert den Beginn der Freisetzung um fast 8 Std, verlängert die Freisetzungszeit auf mehr als 3 Std und reduziert die Autosporenzahl auf die Hälfte von Normal.
Bei Schocks von 4,5° C und darunter bis 1,5° C finden - von Einzelfällen abgesehen - keine Freisetzungen statt, der Pigmentverlust ist total (s. Abb. 4). Weitere Temperaturerniedrigungen bis zum Einfrieren der Algen hätten den Rahmen der Arbeit gesprengt. Über Einfrieren von Algen unter verschiedenen Bedingungen und die späteren Auswirkungen in normalen Temperaturen berichteten u.a. MÜNTZ (1967, 1969, 1971) und SCHWARZE (1975).

3. Die Schockdauer

Die Anwendung von zweistündigen Schocks in dem Standard-Versuch (Abb. 3) erfolgte in Anlehnung an PIRSON, LORENZEN und KOEPPER (1959). Einstündige Schocks führen innerhalb des Zyklus nicht zum totalen Pigmentverlust, dreistündige

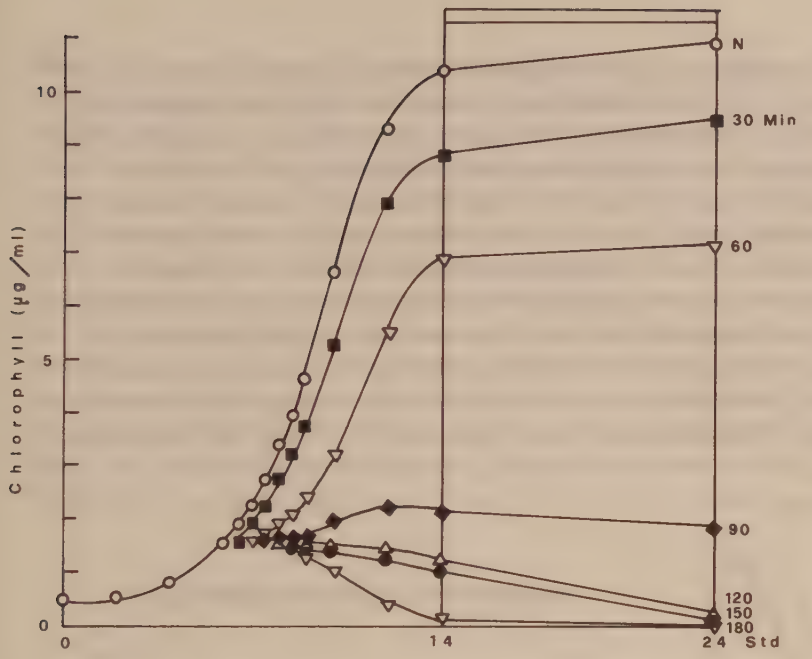

Abb. 10: Chlorophyllverlauf nach unterschiedlicher Schockdauer (0 - 180 Min bei 4,5°C).

Schocks haben bei Chlorella z.T. schon letale Wirkung, während sie bei Scenedesmus obliquus nur wenig stärkeren Effekt zeigen. Unter nachfolgenden DL-Bedingungen genügt zum völligen Ausbleichen der Algen eine Schockdauer von 90 Min.

Weiter wurden die Auswirkungen von Schocks unterschiedlicher Dauer auf Pigmente, Zellzahl und photosynthetische Sauerstoffentwicklung untersucht. Der Verlauf des Chlorophyllgehaltes (Abb. 10) läßt deutliche Abstufungen erkennen. Bei kurzer Applikation der tiefen Temperatur (30 Min) steigt der Chlorophyllgehalt anschließend der Normalkultur vergleichbar an. Wegen der Verkürzung der Synthesezeit wird jedoch deren Endwert nicht erreicht. Längere Schocks beeinflussen die Zellen nicht nur während der Behandlung selbst, sondern auch darüber hinaus: unter den anschließend angewandten

Normalbedingungen laufen Folgeprozesse ab. Nach 60 Min Schock erfolgt zwar noch ein Anstieg des Chlorophyllgehalts, dieser ist aber deutlich verringert, ein Zeichen vorhandener Schädigung. Wird die Kältezeit weiter verlängert (90 Min), so kommt es nach kurzem schwachen Anstieg zu einem Stagnieren des Chlorophyllgehaltes und später noch zu einem schwachen Abfall. Dieser äußerliche Stillstand kann so gedeutet werden, daß Synthese und kältebedingter Abbau des Chlorophylls zu diesem Zeitpunkt mit etwa gleicher Intensität ablaufen, später überwiegt die Schadwirkung und die Nettosynthese wird negativ. Nach zweistündigen Kälteschocks erfolgt das bekannte, völlige Ausbleichen; längere Schocks (150 - 180 Min) bewirken

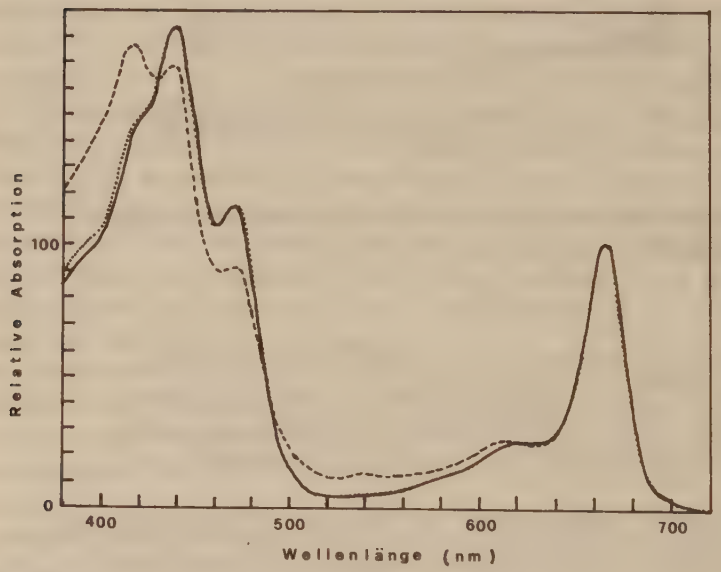

Abb. 11: Absorptionsspektren des Pigmentextraktes aus Chlorellakulturen am Ende des Zyklus nach verschiedener Behandlung. Die Kurven wurden normalisiert: $A_{665} = 100, A_{720} = 0$.

—— Normal
····· 60 Min 4,5°C, Licht
---- 120 Min 4,5°C, Licht

einen noch schnelleren Pigmentabbau. Dehnt man die Kältebehandlung gar auf 4 - 8 Std aus, so nimmt der Chlorophyllgehalt schon langsam während der Behandlung selbst ab, nach Überführen in 32° C wird der Abbau beschleunigt.
Völliges Ausbleichen der Zellen wird unter den gegebenen Bedingungen durch Kälteschock von mindestens 2 Std bewirkt. Ein Vergleich der Spektren der Gesamtpigmentextrakte in Methanol bringt ein ähnliches Ergebnis (Abb. 11). Die bereits in Abb. 6 registrierte, für das völlige Ausbleichen offenbar charakteristische Verschiebung der Absorptionsbanden im blauen Spektralbereich tritt erst nach zweistündigem Schock auf. Eine einstündige Kältebehandlung verringert zwar den Gesamtchlorophyllgehalt, ändert aber noch nicht die Relationen im Spektrum.

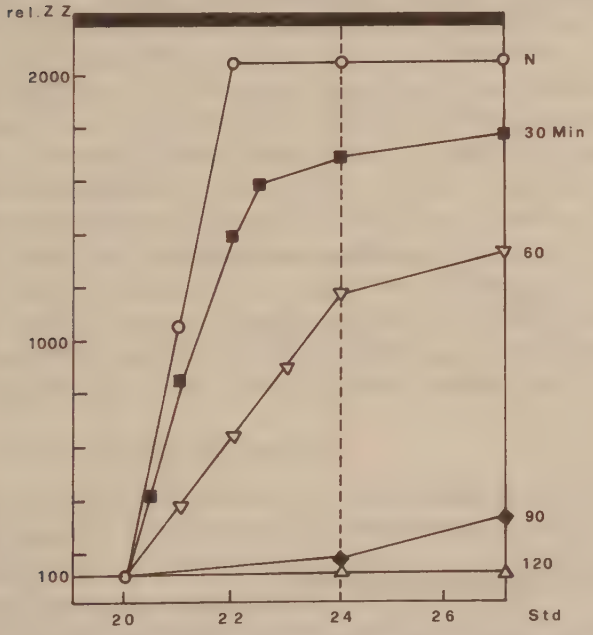

Abb. 12: Relative Zellzahlen von Chlorellakulturen nach unterschiedlicher Schockdauer (0 - 120 Min bei 4,5°C).

Unterschiedliche Schocklängen haben ebenso wie auf die Pigmente auch auf die Zellentwicklung eine abgestufte, hemmende Wirkung (Abb. 12). Eine Normalkultur beginnt in der 20. Std des Zyklus (nach 6 Dunkelstunden) mit der Freisetzung der Autosporen, die nach 2 Std abgeschlossen ist; die rel. Autosporenzahl beträgt im Mittel etwa 2000 (vgl. S.53). Nach Kälteschocks von 30 - 90 Min setzt die Freisetzung zwar pünktlich ein, ist aber nach 4 Std (am Ende der Dunkelzeit) noch nicht abgeschlossen. Bei der 30 Min lang behandelten Kultur ist nach weiteren 3 Std im Dunkel die Freisetzung vollständig, bei 60- und 90-Min-Kulturen bleiben einzelne Zellen auch noch länger ungeteilt. Bei diesen Kulturen ist natürlich auch die Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der Schockdauer vermindert. Ein zweistündiger Kälteschock (Standard-Schock = 7./8. Std bei 4,5° C im Licht) hemmt die Autosporenfreisetzung - von einzelnen Ausnahmen abgesehen - völlig.

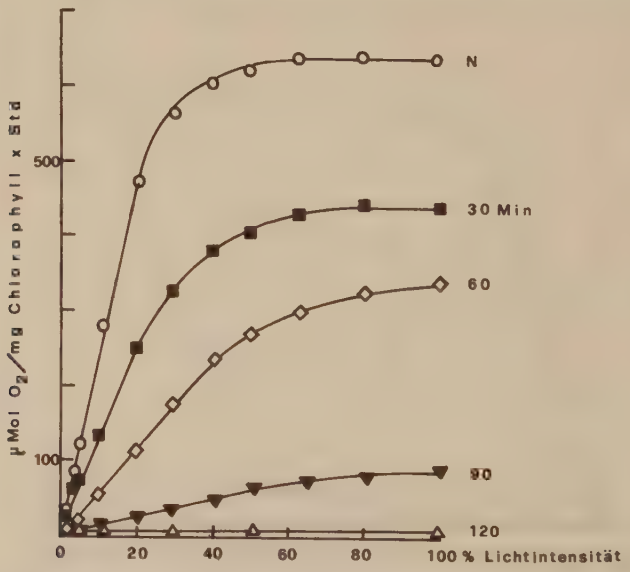

Abb. 13: Photosyntheseleistung von Chlorellakulturen nach Kältebehandlung (4,5°C) von unterschiedlicher Dauer (0 - 120 Min) in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke. Die Messungen erfolgten nach 6 Lichtstunden (Normal) bzw. jeweils unmittelbar nach dem Schock.

Messungen der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung sollen zur weiteren Charakterisierung der Schockwirkungen dienen. Die apparente Sauerstoffproduktion wurde bei verschiedenen Lichtintensitäten unmittelbar nach der Kältebehandlung gemessen (Abb. 13). Auch hier wird eine graduelle Schädigung des Systems deutlich. Mit zunehmender Kältebehandlung wird die Photosynthese stärker gehemmt, nach zweistündigen Schocks ist so gut wie keine Sauerstoffentwicklung mehr zu registrieren, obwohl der Chlorophyllgehalt aller Parallelen gleich ist. Die Unterschiede der Kurven im lichtlimitierenden Bereich bedeuten unterschiedliche Quantenausbeuten, was für eine Teilinaktivierung des photosynthetisch aktiven Chlorophylls spricht. Aus den Abständen der Kurven ersieht man, daß die Schadwirkung während eines zweistündigen Kälteschocks zunächst langsam anläuft, sich dann verstärkt und zuletzt wieder schwächer wird. Eine gewisse Induktionsphase ist unverkennbar und bereits aus der Temperaturanpassung (Abb. 1) der Kultur zu erwarten.
Die Unterschiede außerhalb des lichtlimitierenden Bereichs können auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden wie etwa auf eine Inaktivierung von Enzymen. Während man mit Pigmentanalysen und Spektren eine im Laufe der Zeit nach dem Schock fortschreitende Kälteschädigung nachweisen kann, ist die Sauerstoffmessung ein Indikator für sofort eintretende Effekte. Es muß also ein deutlicher Unterschied zwischen den unmittelbaren, bereits während der Kältebehandlung auftretenden, primären, und den erst im Anschluß daran allmählich meßbaren, sekundären Folgen gemacht werden.

4. Die Bedeutung des Lichtes

Eine Verdunklung während der Kältebehandlung verhindert das Ausbleichen (LORENZEN 1963, MÜNTZ 1967, MARVIN III and KARLANDER 1974). Der Chlorophyllgehalt steigt nach einer solchen Behandlung parallel zur Normalkultur an, kann allerdings während der restlichen Zeit des Zyklus den Vorsprung einer Normalkultur nicht mehr aufholen. Zunächst galt unser Interesse der Frage, ob bzw. in welchem Maße die Lichtintensität während der Kältebehandlung für die Ausprägung des Schocks

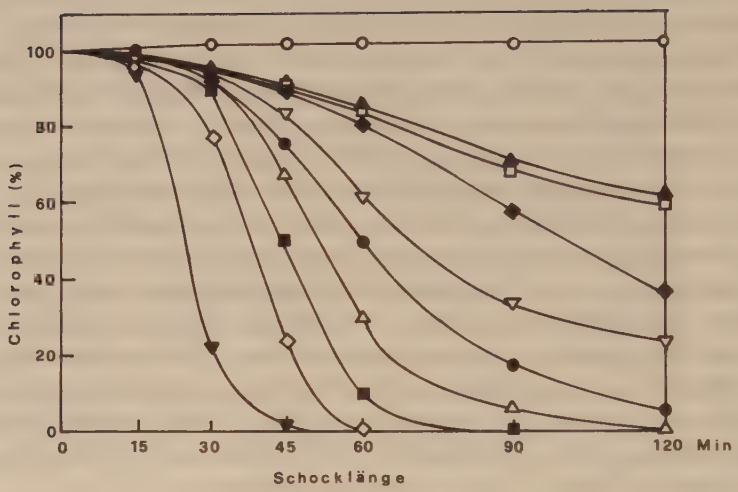

Abb. 14: Chlorophyllgehalt von Chlorellakulturen am Ende des Zyklus in Abhängigkeit von der Schocklänge und der Beleuchtungsstärke während des Schocks. Chlorophyllgehalt der Normalkultur = 100%.

□—□	32°C, Dunkel
▲—▲	4,5°C, Dunkel
○—○	32°C, 12,0 x 10^4 erg x Sek^{-1} x cm^{-2}
▼—▼	4,5°C, 12,0 "
◇—◇	4,5°C, 8,5 "
■—■	4,5°C, 6,5 "
△—△	4,5°C, 4,2 "
●—●	4,5°C, 3,2 "
▽—▽	4,5°C, 2,2 "
◆—◆	4,5°C, 1,3 "

Die Lichtenergie im Lichtthermostaten betrug maximal 1,7 x 10^4 erg x Sek^{-1} x cm^{-2}, was etwa 18000 Lux entspricht.

mitverantwortlich ist (Abb. 14). Mit erhöhter Lichtintensität wird die Chlorophylldifferenz gegenüber der Normalkultur größer. Völliges Ausbleichen ist schon nach kürzerem Schock (z.B. 45 Min) zu erreichen, wenn die Lichtintensität entsprechend hoch ist. Das Spektrum des Gesamtpigmentextraktes einer solchen Kultur zeigt die chrakteristische Verschiebung im blauen Spektralbereich (vgl. Abb. 11 120 Min Schockdauer), diese ist also ein von der Dauer der vorangegangenen Behandlung unabhängiges Zeichen für völliges Ausbleichen.

Dazu sind zwei Dinge zu bemerken: Einmal muß daran erinnert werden, daß in die Dauer der Kältebehandlung auch die Zeit der Temperaturadaptation eingeht (vgl. Abb. 1), zum anderen muß ergänzt werden, daß die verwendete maximale Lichtintensität noch nicht so hoch ist, daß sie auch bei normaler Temperatur zum Ausbleichen führt.Der einfache Effekt eines "photobleaching" bei sehr hohen Lichtintensitäten (100 000 Lux und mehr), wie er von zahlreichen Autoren beschrieben

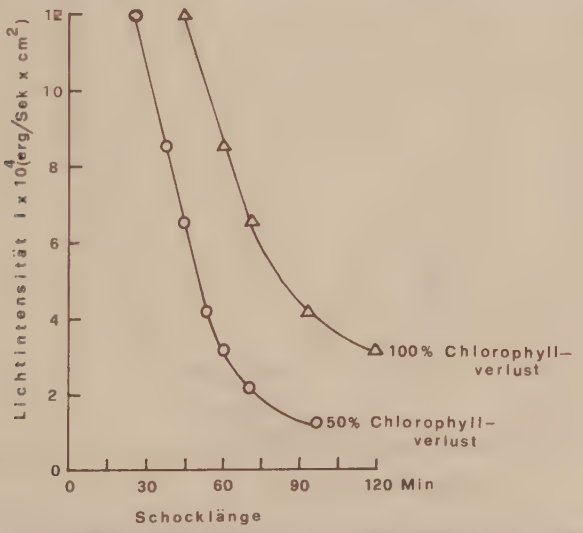

Abb. 15: Chlorophyllverlust von kältebehandelten Kulturen gegenüber einer Normalkultur in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und der Lichtintensität während der Behandlung.

wird (u.a. AACH 1953, SIRONVAL and KANDLER 1958, CLAES und NAKAYAMA 1959, RUDOLPH und BUKATSCH 1967, THOMAS and NIJHUIS 1968), liegt also nicht vor.
Verwendet man während der Kältebehandlung sehr schwache Lichtintensitäten, so ist auch nach längerer Schockdauer kein völliges Ausbleichen zu erreichen. In einem bestimmten Bereich der Lichtintensität scheint jedoch der Bleicheffekt ein Produkt aus I x t (Lichtintensität während des Schocks x Dauer des Schocks) zu sein (Abb. 15).
Die verwendeten Intensitäten sind bei Normaltemperatur (32° C) ohne schädigende Wirkungen; die tiefe Temperatur bei Verdunklung führt nicht zu Schädigungen des Pigmenthaushaltes und des Zellwachstums. Nur die Kombination von tiefen Temperaturen und Licht - in einem bestimmten Entwicklungsstadium der Zelle und über einen bestimmten Zeitraum appliziert - führt zu dem vorliegenden Phänomen des Ausbleichens und der Hemmung der Zellentwicklung.
In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob neben der

Abb. 16: Chlorophyllgehalt von Chlorellakulturen, die einer Kältebehandlung bei Rotlicht bzw. Blaulicht von gleicher Intensität ausgesetzt waren. (Messung am Ende des Zyklus).

Lichtintensität auch qualitativ unterschiedliches Licht während der Kältebehandlung für die Ausbildung der Schockwirkungen von Bedeutung sind. Wie zahlreiche Ergebnisse über die Auswirkungen von Blau- und Rotlicht auf einzellige Grünalgen beweisen (u.a. WARBURG et al. 1954, KOWALLIK 1962, ADLER 1967), können bei diesen Organismen durch Belichtung mit unterschiedlichen Spektralbereichen große Unterschiede im Stoffwechsel bzw. in der Zusammensetzung auftreten. Die Algen wurden deshalb in der empfindlichen Phase 4,5° C bei Rot- bzw. Blaulicht ausgesetzt. Wegen der verringerten Lichtintensität wurde die Behandlung bis auf 6 Std ausgedehnt.

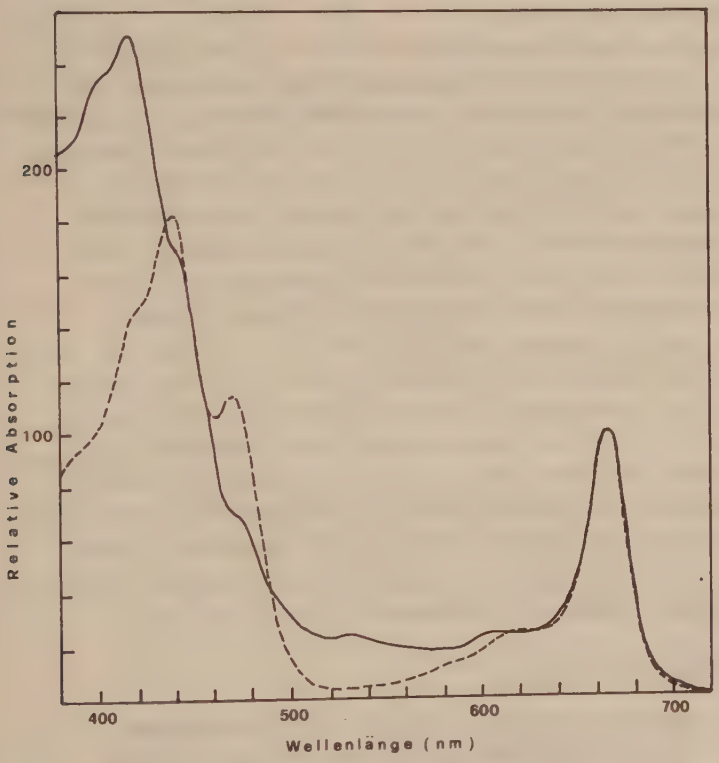

Abb. 17: Absorptionsspektren von Pigmentextrakten am Ende des Zyklus von Chlorellakulturen mit verschiedener Behandlung.

—— 6 Std 4,5°C, Blaulicht

---- 6 Std 4,5°C, Rotlicht

Die Kurven wurden normalisiert: $A_{665} = 100, A_{720} = 0$.

Mit fortschreitender Farblichtbehandlung macht sich ein deutlicher Unterschied bemerkbar (Abb. 16). Nach 3 Std Kältebehandlung im Blaulicht weist die Kultur später nur noch 20 % des Chlorophyllgehaltes einer Normalkultur auf, während die Rotlichtkultur noch mehr als 60 % hat. Nach vierstündiger Behandlung ist der Chlorophyllgehalt der Blaulichtkultur am Ende des Zyklus sogar niedriger, als er vor dem Kälteschock war, demgegenüber ist der Chlorophyllgehalt der Rotlichtkultur angestiegen. Ein entsprechend langes Einwirken von Rot- bzw. Blaulicht unter Normalbedingungen verursacht bis zum Ende des Zyklus keine Unterschiede im Chlorophyllgehalt dieser Kulturen.
Blaulicht schädigt das Pigmentsystem also deutlich stärker als Rotlicht, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KANDLER und SCHÖTZ (1956) steht. Der starke Abbau des Maximums bei 470 nm im Pigmentspektrum (Abb. 17) und die bereits wiederholt registrierte Verschiebung des Maximums von 440 nm in den kurzwelligen Bereich tritt nur bei Blaulichtbestrahlung auf. Somit kann man durch veränderte Außenbedingungen (hier der Lichtqualität und Kälte) zwei Folgeprozesse des Kälteschocks unterscheiden: eine Schädigung der Gesamtchlorophylle durch totale Hemmung der Synthesen und eine Absorptionsänderung im blauen Spektralbereich als Folge des Chlorophyllabbaus. Wie zu vermuten, ist die schädigende Kältewirkung auch auf Wachstum und Entwicklung durch Blaulicht größer als durch Rotlicht (Tab. 7). Die Unterschiede werden nach dreistündiger Behandlung deutlich; verlängert man die Schockdauer weiter, so wird die Autosporenfreisetzung sowohl durch Blaulicht als auch durch Rotlicht völlig gehemmt,in der Zellgröße treten jedoch auch weiterhin Unterschiede auf.

5. Die Bedeutung der Begasung

Werden die Kulturen während der üblichen Kältebehandlung kräftig mit Stickstoff begast, so ist der folgende Bleicheffekt stark vermindert (Tab. 8; vgl. auch LORENZEN 1963). Der Chlorophyllgehalt liegt zwar deutlich unter dem der Normalkultur - schließlich ist ja auch die Photosynthese für 2 Std unterbrochen - die Zellen bleichen aber nicht aus.

Tab. 7

Zellentwicklung von Chlorellakulturen nach Kälteschocks im Rot- bzw. Blaulicht

Behandlung in der kritischen Phase	Chl µg/ml	ZZ	Charakterisierung, jeweils am Ende des Zyklus
Normal	9,8	1960	vollsynchron
4,5° C Blaulicht			
60 Min	7,65	1400	wenige noch ungeteilt
120 "	4,62	720	Freisetzungszeit verlängert, Autosporen ungleich groß
180 "	1,8	143	nur wenige Autosporen, Unterschiede in Größe und Farbe der Zellen
240 "	0,8	99	Zellen ± einheitlich, keine Autosporen
300 "	0,1	100	einheitlich kleine, weiße Zellen
360 "	0,1	100	einheitlich kleine, weiße Zellen
Rotlicht			
60 Min	7,93	1280	vollsynchron
120 "	6,9	880	Freisetzungszeit verlängert, Autosporen ungleich groß
180 "	6,5	460	viele Himbeerstadien, z.T. gerade bei der Freisetzung
240 "	4,6	100	keine Freisetzung, Zellen einheitlich mittelgroß, noch keine Himbeerstadien
300 "	2,6	100	einheitlich mittelgroße, in der Farbe zwischen hellgrün und weiß variierende Zellen
360 "	1,9	100	einheitlich mittelgroße, in der Farbe zwischen hellgrün und weiß variierende Zellen

Tab. 8

Einfluß der Qualität der Begasung während der kritischen Phase im Synchronzyklus von Chlorella pyrenoidosa

Begasung in der kritischen Phase	Chlorophyll (µg/ml) bei Behandlung mit	
	4,5° C	32° C
Luft + 3 % CO_2	0,1	10,1
100 % Stickstoff	6,0	6,2
Stickstoff + 3 % CO_2	5,1	7,8
Stickstoff + 20 % Sauerstoff	0,2	5,4
100 % Sauerstoff	0,1	5,6

Auch ohne Kälteschock verringert sich der Chlorophyllgehalt durch eine Stickstoffbegasung. Kombiniert man die beteiligten Gase, so zeigt sich, daß neben der tiefen Temperatur und dem Licht der Sauerstoff als dritte exogene Komponente für den Bleicheffekt notwendig ist (vgl. MÜNTZ 1967, RUDOLPH und BUKATSCH 1967 u.a.). Deshalb ist auch ein weitgehender Sauerstoffentzug vor Beginn des eigentlichen Schocks, den man durch 15 Min Stickstoffbegasung im Licht erreicht, Voraussetzung für das erwähnte Ergebnis.
Untersuchungen der Zellentwicklung bestätigen die Ergebnisse der Pigmentanalysen. Algen, die parallel zur Kältebehandlung verdunkelt oder mit Stickstoff begast werden, können in der darauffolgenden Dunkelzeit verspätet, nicht synchron und mit geringerer Schubhöhe noch Autosporen freisetzen (Abb. 18). Dieser große Unterschied zur Normalkultur besagt, daß trotz Verdunklung oder Stickstoffbegasung eine Schockwirkung auftritt. Sie beeinflußt die Zellfreisetzung stärker als den Pigmenthaushalt.
In Parallelversuchen mit Verdunklung bzw. Stickstoffbegasung bei 32° C treten die Freisetzungen zwar nur mit geringerer Verzögerung ein, die Autosporenzahl beträgt aber nur die Hälfte der Normalkultur. Die Alge ist in der kritischen Phase nicht nur gegenüber dem Standard-Schock äußerst sensibel, sondern im hohen Grade auch gegen andere Veränderungen der exogenen Faktoren.

Wie Pigmentgehalt und Zellentwicklung so kann auch die photosynthetische Sauerstoffentwicklung durch Verdunklung oder Stickstoffbegasung vor der vollen Kälteschädigung geschützt werden. Betrachten wir zunächst die potentielle Sauerstoffentwicklung von Chlorella im normalen Synchronzyklus (Abb. 19 oben): ein Anstieg der Sauerstoffproduktion bis zum Ende der Lichtzeit, eine Verringerung zu Beginn der

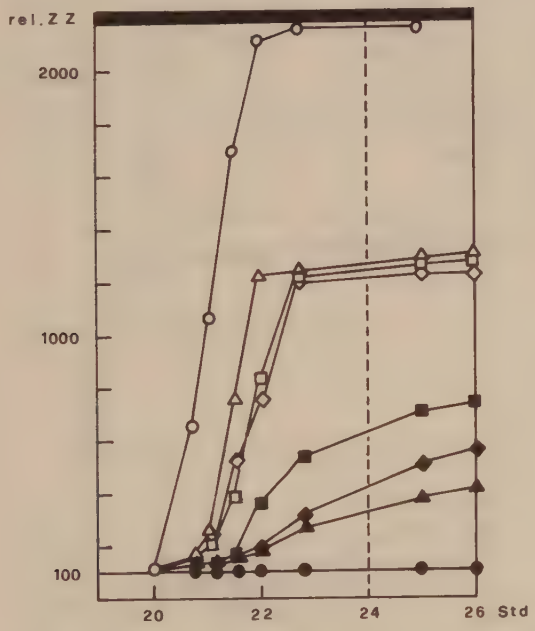

Abb. 18: Relative Zellzahlen von Chlorellakulturen mit unterschiedlicher Behandlung in der 7. und 8. Std.

- 32°C, Licht, Normalbegasung (Normalkultur)
- 32°C, Licht, Stickstoffbegasung
- 32°C, Dunkel, Normalbegasung
- 32°C, Dunkel, Stickstoffbegasung
- 4,5°C, Licht, Normalbegasung
- 4,5°C, Licht, Stickstoffbegasung
- 4,5°C, Dunkel, Normalbegasung
- 4,5°C, Dunkel, Stickstoffbegasung

Dunkelzeit und zuletzt ein erneuter Anstieg kennzeichnen die Normalkultur (vgl. TISCHNER 1974). Die beiden Kulturen mit Kälte/Dunkel- bzw. Kälte/Licht/Stickstoff-Behandlung

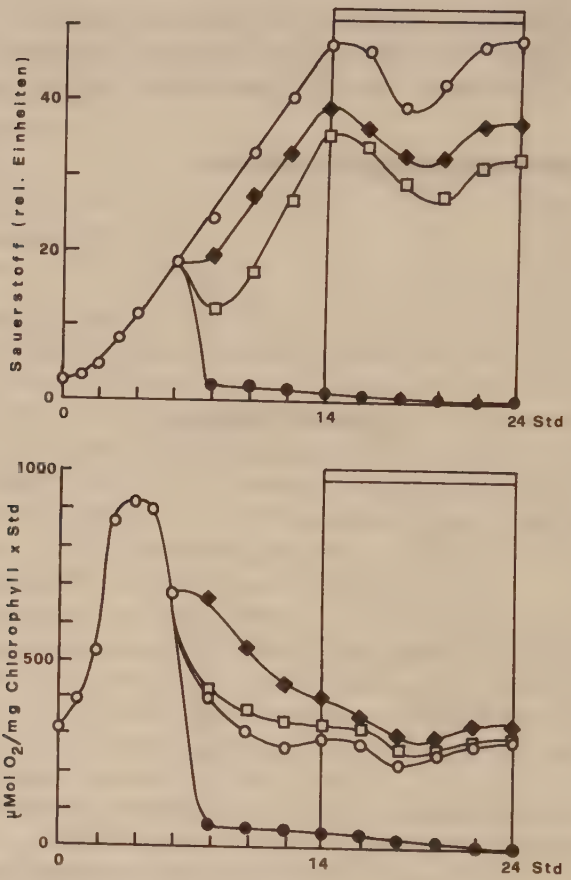

Abb. 19: Sauerstoffentwicklung von Chlorella nach verschiedener Kältebehandlung. Oben: rel. Sauerstoffentwicklung. Unten: auf Chlorophyllgehalt bezogene Sauerstoffentwicklung.

- o—o Normal
- ●—● 2 Std 4,5°C, Licht
- ◆—◆ 2 Std 4,5°C, Licht, Stickstoffbegasung
- □—□ 2 Std 4,5°C, Dunkel

zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf der Sauerstoffproduktion. Naturgemäß liegen diese Werte unter denen der Normalkultur. Ein sehr starker Abfall innerhalb kurzer Zeit erfolgt nach dem Standard-Schock (Kälte/Licht), lange vor dem "vollständigen" Ausbleichen der Algen. Bezieht man die

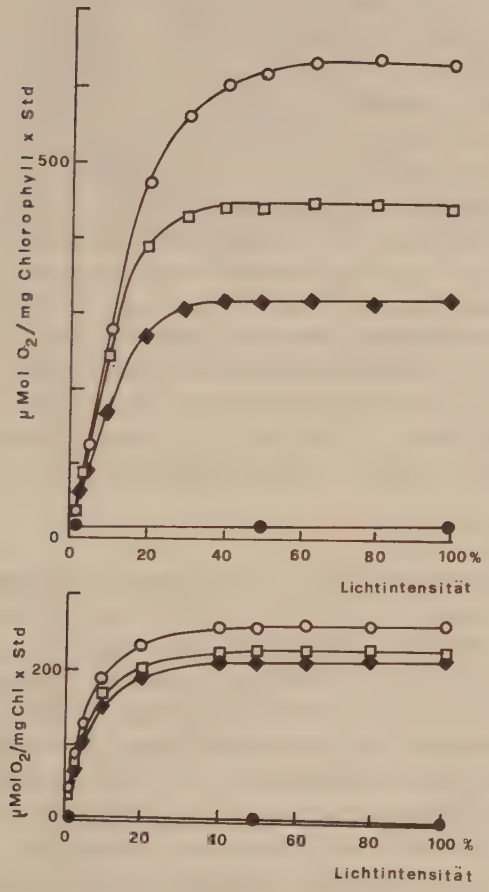

Abb. 20: Photosyntheseleistung von Chlorellakulturen nach verschiedener Behandlung in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke. Oben: nach 6 Lichtstunden (Normal) bzw. unmittelbar nach der zweistündigen Behandlung. Unten: nach 24 Std.

○——○ Normal, ◆——◆ 2 Std 4,5°C, Licht, Stickstoffbegasung, ●——● 2 Std 4,5°C, Licht, □——□ 2 Std 4,5°C, Dunkel

photosynthetische Sauerstoffproduktion auf Chlorophyll, so erhält man für die Normalkultur einen Verlauf (Abb. 19 unten) mit einem starken Anstieg zu Beginn der Lichtzeit und einem Maximum zwischen 4. und 6. Std, anschließend einen Abfall bis zum Ende der Lichtzeit. In der Dunkelzeit des Zyklus bleiben die Werte ziemlich konstant. Ähnliche Ergebnisse finden sich u.a. bei METZNER und LORENZEN (1960) und TISCHNER (1974). Auch zur Schädigung des Photosyntheseapparates ist neben Kälte und Licht Sauerstoff notwendig. Abb. 20 stellt die Sauerstoffentwicklung der verschieden behandelten Kulturen bei abgestuften Lichtintensitäten dar. Die nicht im lichtlimitierenden Bereich auftretenden Unterschiede deuten auf verschieden starke Beeinträchtigungen außerhalb des Pigmentsystems, z.B. im Calvinzyklus hin (vgl. MYERS and GRAHAM 1975). Eine signifikante Abweichung der mit Stickstoff begasten Schock-Kultur direkt nach der Kältebehandlung im lichtlimitierenden Bereich (Abb.20 oben) zeigt an, daß trotz der nachgewiesenen Schutzfunktion des Stickstoffs eine teilweise Inaktivierung von Chlorophyll nicht verhindert wird. Nach 24 Std (Abb. 20 unten) haben sich diese Unterschiede wieder etwas ausgeglichen.

6. Nachbehandlungen

Unter den gegebenen Umständen findet eine Temperaturanpassung beim Umhängen der Kulturen von 32° C in 4,5° C u.u. in ca. 30 Min statt (Abb. 1). Diese Zeit rechnet zur Schockdauer. Ein schnelleres Abkühlen (z.B. durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff) stieß auf technische Schwierigkeiten. Gleichmäßiges, langsames Abkühlen vor dem eigentlichen Schock sowie eine ebenso langsame Wiedererwärmung auf 32° C danach hatte im Licht wie im Dunkel keinen Einfluß auf das Ausbleichen der Zellen (vgl. MÜNTZ 1969). Der zweimalige Temperatursprung ist offenbar ohne besondere Bedeutung für den Bleicheffekt.

Es wurde auch untersucht, ob eine Aufteilung der zweistündigen Kältebehandlung in zwei Teilschocks von 1 Std Dauer eine Veränderung der Folgen bedingt. Nach 1 Std Kälteschock wurden die Kulturen für die Dauer von 0 bis 30 Min in andere Kultur-

bedingungen überführt, bevor sich die zweite Std mit Kältebehandlung anschloß. Eine zwischenzeitliche Überführung in Normalbedingungen (32° C, Licht) kann den Chlorophyllverlust auf die Hälfte reduzieren (Abb. 21). Die Dauer von 25 - 30 Min reicht gerade aus, um die Kultur von 4,5° C wieder auf ca. 32° C zu erwärmen. Die Temperatur ist für diesen Schutzeffekt allerdings nicht allein verantwortlich, wie man aus dem Vergleich ersehen kann (Tab. 9). Zwischenbehandlungen von 30 Min in 32° C und Dunkel sowie 4,5° C und Dunkel haben gegenüber dem Standardschock keinen Effekt.
Veränderte Bedingungen vor dem Schock, z.B. solche, die das Wachstum und Entwicklung der Zellen hemmen (WANKA 1968) oder den Synchronisationsgrad beeinflussen, führen dazu, daß die

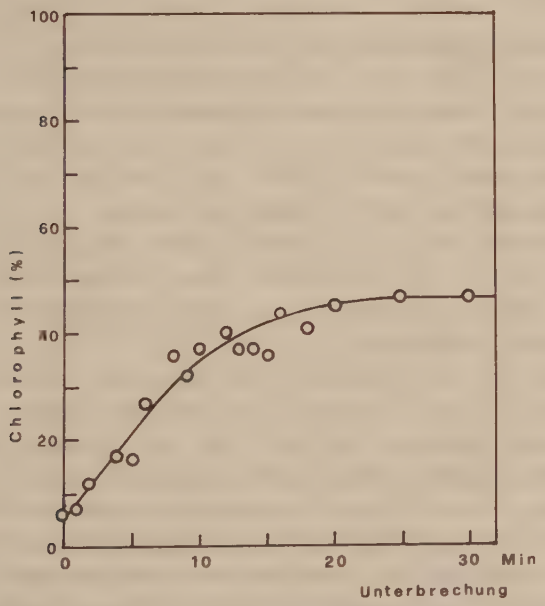

Abb. 21: Abschwächung der Kälteschockwirkung in Abhängigkeit von der Dauer der Unterbrechung der Behandlung nach 1 Std durch Überführen in 32°C und Licht, dargestellt am Chlorophyllgehalt nach 24 Std (Chlorophyllgehalt der Normalkultur = 100%).

Tab. 9

Chlorophyllgehalt von kältegeschockten Chlorella-Kulturen (24. Std) in Abhängigkeit von den Bedingungen einer "Zwischenbehandlung"

Behandlung der Kultur in der kritischen Phase	Chlorophyllgehalt (24. Std) (µg/ml)
60 Min Kälte/Licht, 30 Min Wärme/Licht, 60 Min Kälte/Licht	5,8
60 Min Kälte/Licht, 30 Min Wärme/Dunkel, 60 Min Kälte/Licht	1,0
60 Min Kälte/Licht, 30 Min Kälte/Dunkel, 60 Min Kälte/Licht	0,6
Wärme/Licht (Normal)	10,9

Algen zur Zeit der Kältebehandlung nicht alle in ihrer empfindlichsten Phase sind, d.h. die Ergebnisse werden verfälscht. Deshalb ist unter unseren Bedingungen eine Vorbehandlung zum Zwecke der Abhärtung, wie sie u.a. von RUDDAT (1961), STEPONKUS and LANPHEAR (1968) sowie STEWARD and GUINN (1969) durchgeführt wurde, nicht zweckmäßig. Ein Vorkühlen der Autosporen bei 4,5° C unmittelbar nach ihrer Freisetzung (22. - 24. Std) vor Beginn eines neuen Zyklus macht die Algen nicht resistent, nach einem Standard-Schock bleichen auch diese Zellen aus.

Eine andere Frage ist allerdings, ob die Lage und Intensität der Empfindlichkeit ausschließlich vom Entwicklungsalter der Zellen im Licht abhängig ist. Wie aus den Arbeiten von LORENZEN und HESSE (1968), HESSE (1972) sowie GALLING et al. (1975) hervorgeht, weist Chlorella charakteristische Schwankungen in der Produktionsfähigkeit in Abhängigkeit von der Dauer einer dem Normalzyklus vorgeschalteten Wartezeit im Dunkel auf. Es sollte nun geklärt werden, ob und in welchem Maße die somit für Chlorella nachgewiesene endogene circadiane Rhythmik von Bedeutung für die Auswirkungen des Kälteschocks ist. Zunächst wird der verkürzte Grundversuch (vgl.

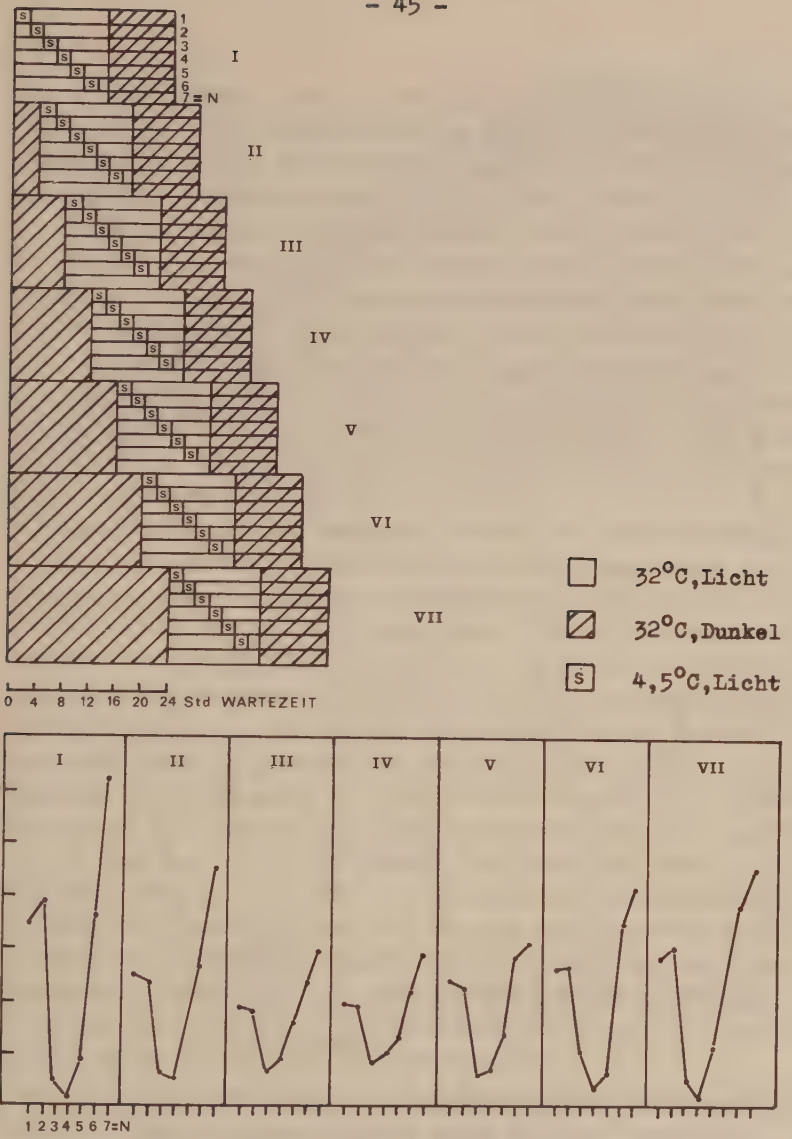

Abb. 22: Kälteresistenz im Synchronzyklus von Chlorella in Abhängigkeit von der Dauer vorgeschalteter Wartezeiten im Dunkel. Oben: Schema der Versuchsanordnung (vgl. Abb. 3). Unten: Dargestellt sind die jeweils am Zyklusende einer jeden Versuchsgruppe (I - VII) gemessenen Chlorophyllwerte.

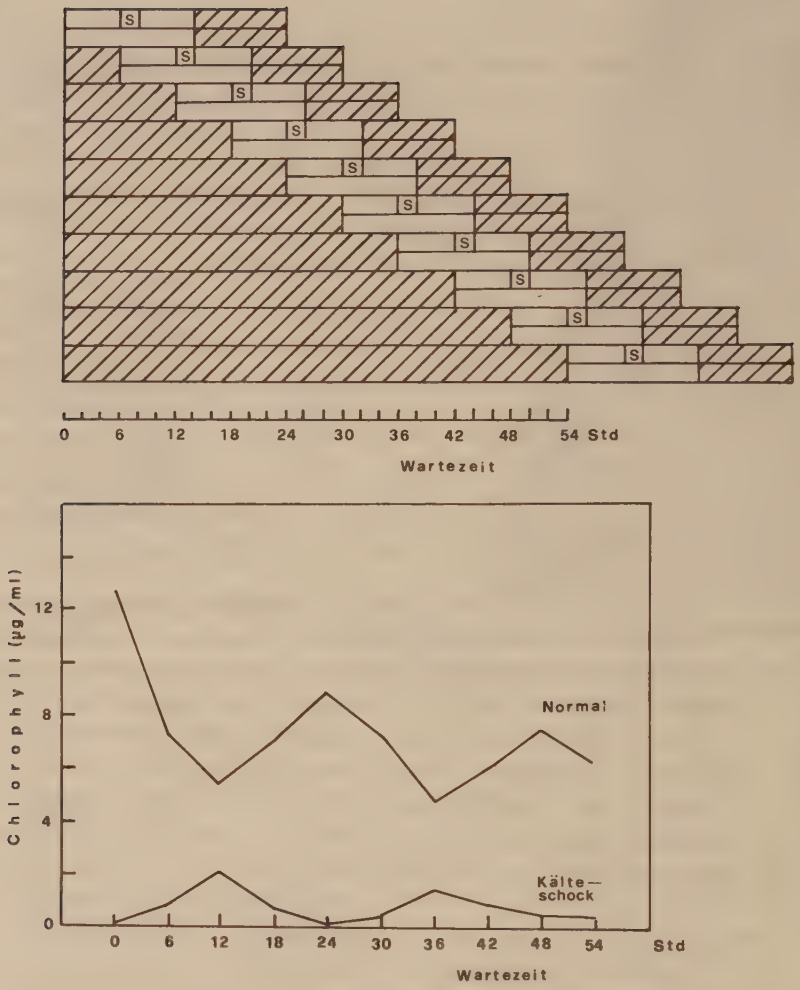

Abb. 23: Auswirkung des Kälteschocks (2 Std 4,5°C) in Abhängigkeit von der Dauer vorgeschalteter Wartezeiten im Dunkel. Oben: Schema der Versuchsanordnung. Unten: Dargestellt sind die am Ende eines jeden Zyklus gemessenen Chlorophyllwerte.

Abb. 3) wie üblich (Abb. 22 oben, I) und mit 6 Varianten (II - VII, 4 - 24 Std Wartezeit im Dunkel vor dem Testzyklus) durchgeführt und am Ende die Chlorophyllwerte bestimmt (Abb. 22 unten). Erwartungsgemäß nimmt die Chlorophyllproduktion der Normalkultur mit zunehmender Wartezeit bis zu 12 Std ab, dann bis zu 24 Std wieder zu. Die Empfindlichkeit gegen die Kältebehandlung wird mit zunehmender Wartezeit zunächst leicht abgeschwächt, die sensible Phase etwas nach vorn verschoben - bei 12 Std Wartezeit tritt das stärkste Ausbleichen nach Kälteschock in der 5. und 6. Std auf - dann erfolgt bis 24 Std wieder eine umgekehrte Orientierung. Die Lage der kritischen Phase ist also nur in geringem Maße von endogenen Schwankungen abhängig.

Vergleicht man nur die in der 7. und 8. Std kältebehandelten Kulturen mit ihren Normalkulturen in Abhängigkeit von der vorgeschalteten Wartezeit im Dunkel (Abb. 23), so stellt man nicht nur eine circadiane Schwankung in der Chlorophyllproduktion der Normalkultur, sondern auch im schwachen Maße in der Sensibilität gegen den Kälteschock fest. Grundsätzlich kann man ableiten, daß die Empfindlichkeit einer Kultur proportional ihrer Produktivität ist. Dies zeigt sich auch bei Kulturen mit weniger hohem Synchronisationsgrad: Die Gesamtproduktion der Normalkultur ist erniedrigt und kältegeschockte Zellen bleichen nicht völlig aus. Für Bacillus subtilis beschrieben SATO et al. (1968) eine Empfindlichkeit gegen Kälteschocks, die ebenfalls auf ein Stadium mit besonders aktivem Stoffwechsel beschränkt ist. Tatsächlich befinden sich die synchronen Chlorellazellen während der kritischen Phase in einem Abschnitt höchster stoffwechselphysiologischer Aktivität (NELLE et al. 1975, vgl. Diskussion S.105).

Eine weitere Bestätigung dieser Zusammenhänge ergibt sich aus dem Ergebnis eines Versuchs nach SOEDER et al. (1966) und HESSE (1972). Gibt man einer dauersynchronen Kultur während der üblichen zehnstündigen Dunkelzeit Schwachlicht von ca. 20 Lux, so klingt die endogene Rhythmik aus und als Folge wird die Produktion im nächsten Zyklus stark reduziert. Benutzt man derart vorbehandelte Algen als synchrones Ausgangsmaterial für den Standard-Versuch (Abb. 3), so findet man die Kulturen im Vergleich zu denen mit normaler Vorbehandlung

(Dunkel) weniger stark ausgebleicht; die Lage der sensiblen Phase bleibt allerdings unverändert. Dieses Ergebnis wurde auch für Chlamydomonas und Ankistrodesmus bestätigt.

Verlängert man die Lichtzeit nach dem Schock auf 12 Std, so wird die empfindliche Phase im Zyklus von Chlorella deutlich verlängert (Abb. 9). Die Lichtmenge nach der Kältebehandlung hat also ebenfalls großen Einfluß auf das Ausbleichen. Den Nachweis erbringt ein Versuch, bei dem parallele Kulturen nach dem Schock bis zum Beginn der Dunkelzeit verschiedenen Lichtintensitäten ausgesetzt sind. Man erhält dann im Grad der Pigmentschädigung eine Abhängigkeit von der Intensität (Tab. 10). Geringere Intensität des Lichtes nach dem Schock kann den Bleicheffekt im geringen Maße hemmen, eine Neusynthese des Chlorophylls erfolgt allerdings nicht. Hier wird deutlich, daß eine Vielzahl von Faktoren für den totalen Pigmentverlust verantwortlich ist.

Tab. 10

Chlorophyllgehalt von normalen und kältebehandelten Chlorella-Kulturen (24. Std) in Abhängigkeit von der Lichtintensität nach der Behandlung

Lichtintensität 8. - 14. Std		Chlorophyll (%)	
Lux	%	Normal	Schock
20000	100	100	2,7
18000	90	99	3,3
15000	75	98	16
12000	60	96	20
10000	50	88	22
6000	30	75	23
2000	10	64	24

Wenn aber verringerte Lichtintensitäten in der Nachbehandlung zu einer Verzögerung des Bleicheffektes führen können, so sollte eine Verdunklung zur nämlichen Zeit noch größere Wirkung erzielen. So kann man z.B. auch eine Erholung von

Photooxidationen durch Starklicht registrieren, wenn man die Organismen wieder in schwächeres Licht oder Dunkel gibt (SOROKIN 1960). Setzt man die Schock-Kultur bis zum Zyklusende ins Dunkle, so findet man nur einen sehr geringen Chlorophyllverlust. Überführt man nach kurzer Dunkelzeit wieder in Licht, so erfolgt dennoch ein Pigmentabbau. Nach einer längeren Dunkelzeit (mindestens 6 Std) steigt der Chlorophyllgehalt nach Wiederbelichtung verlangsamt an. Nach 12 Std Verdunklung entspricht die Chlorophyllsyntheserate schließlich wieder der der ungeschockten Kultur (Abb. 24).

Es wird angenommen, daß durch den Schock angehäufte Zwischenprodukte, die im Licht zur Chlorophyllzerstörung führen

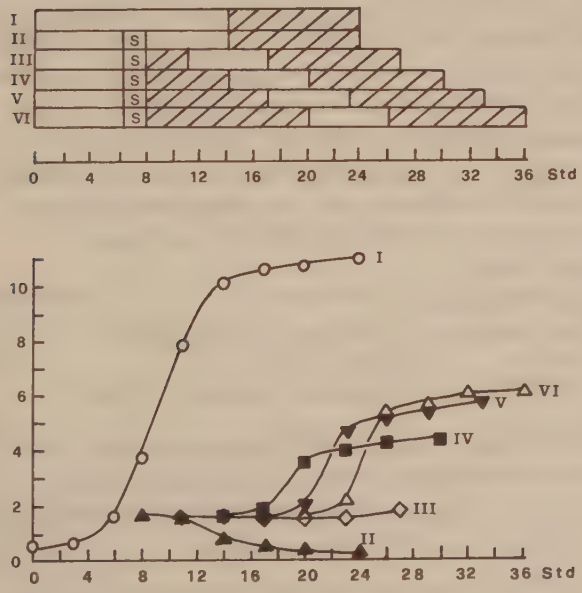

Abb. 24: Einfluß von Dunkelzeiten auf die Auswirkung des Kälteschocks.
Oben: Schema der Versuchsanordnung.
Unten: Verlauf des Chlorophyllgehaltes einer Normalkultur (I) und kältegeschockter Kulturen (II - VI).

(vgl. RUDOLPH und BUKATSCH 1967), in der Dunkelzeit wieder in den reduzierten Zustand überführt werden. Dieser Prozess ist an Dunkelheit gebunden; in einem Parallelversuch, in dem die Dunkelzeiten durch entsprechend lange Zeiten mit 32° C und Schwachlicht (1000 Lux) ersetzt werden, bleichen die Zellen anschließend fast völlig aus.
Die aus diesem Ergebnis resultierende Überlegung, eine Nachhandlung mit Stickstoffbegasung könnte eine ähnliche Wirkung haben, wurde experimentell widerlegt. Der Sauerstoff spielt also nach erfolgtem Standard-Schock, wo er unbedingt nötig ist, für das Ausbleichen nicht mehr die Rolle wie das Licht.

7. Zusatz von Chemikalien

In zahlreichen Fällen ist es bei verschiedenen Objekten gelungen, den Schadeffekt von Kältebehandlungen durch Zugabe von Chemikalien zu verringern bzw. zu verhindern. Häufig handelt es sich um Temperaturen unter 0° C, die Stoffe wirken dann als "Frostschutzmittel". Die Wirkungsweise der einzelnen Stoffe kann aber sehr unterschiedlich sein (Reduktion, Entwässerung). Oft wirkt der Schutzstoff auf Membranen, deren Permeabilität er erhöht. Es muß dabei jedoch beachtet werden, daß solche Chemikalien vielseitig auf den Organismus wirken.
Ein "Schutzstoff" muß folgende Eigenschaften besitzen:
er darf nicht giftig sein,
er muß ein niedriges MG haben,
er muß eine hohe Löslichkeit in wäßrigen Salzlösungen besitzen und
er muß in eine lebende Zelle eindringen können (LOVELOCK and BISHOP 1959).
In Tab. 11 sind einige Agentien mit Kälteschutzfunktion aufgeführt, von denen Ascorbinsäure, Glucose, Glycerin, KNO_3, Na_2SO_3 und $MgCl_2$ getestet wurden. Die Wirkungen von Glycerin, $MgCl_2$ und Na_2SO_3 sind in Tab. 12 wiedergegeben.

Die Stoffe haben bei den verwendeten Konzentrationen auf Normalkulturen schon eine schädigende Wirkung. Deshalb wäre es sicher besser, natürliche, in der Zelle vorkommende Agentien wie Ascorbinsäure (RUDOLPH und BUKATSCH 1967), Kohlenhydrate (HEBER 1958) oder Carotinoide (CLAES und NAKAYAMA 1959,

Tab. 11

Agentien mit Kälteschutzfunktion

Agentien	Objekt	Literatur
Decenylsuccinylsäure	Phaseolus	KUIPER 1964
Saccharose	Spinatchloroplasten	SANTARIUS 1969
"	Bacillus subtilis	SATO et al. 1968
Rohrzucker, Glycerol, Dimethylsulfoxid	Daucus, Ipomoea	LATTA 1971
Dimethylsulfoxid	Erythrozyten von Mensch und Rind	LOVELOCK and BISHOP 1959
Trimethylamin	Chromobacterium	EFTHIMION and CORPE 1969
Mg^{2+}	E. coli	SATO and TAKAHASHI 1968
	E. coli	STRANGE 1968
	Pseudomonas	MACKELVIE et al. 1968
	Pseudomonas	FARELL and ROSE 1968
Picolinsäure, Dexon	Baumwolle	AMIN 1969
NADPH	Pisum sativum	KURAISHI et al. 1968
Glycerin	Chlorella	SCHWARZE 1975
Schutz gegen hohe Lichtintensität		
Ascorbinsäure, Natriumsulfit	Rumex	RUDOLPH und BUKATSCH 1967

CLAES 1962, KRINSKY 1968) zu verwenden.
Im Falle unserer kältegeschockten Algen konnte für Ascorbinsäure kein eindeutiger Schutzeffekt nachgewiesen werden. Ein hoher KH-Gehalt kann einer physiologischen Schädigung von Zellen entgegenwirken (u.a. HEBER 1958, FRANCK and FRENCH

Tab. 12

Wirkung von Kälteschutzmittel bei Chlorella

Agentien	Endkonzentration	Behandlung	Chlorophyll 24. Std (in % von Normal)
Glycerin	1 M	Normal	56
	1 M	Schock	28
	---	Schock	3
$MgCl_2$	10^{-1} M	Normal	95
	10^{-1} M	Schock	23
	---	Schock	5
Na_2SO_3	10^{-1} M	Normal	17
	10^{-1} M	Schock	15
	---	Schock	3

1941). Zugabe von Glucose bewirkte allerdings bei Chlorella sowohl für Normalkultur wie auch Schock-Kultur völliges Ausbleichen. Die Bedeutung von Carotinoiden als Schutzpigment gegen Ausbleichen wurde in Anlehnung an KRINSKY (1968) untersucht. Die Ergebnisse werden in anderem Zusammenhang diskutiert (Kap. II, 3).

II. Charakterisierung der Algen im Verlaufe des Normalzyklus, nach dem Kälteschock und während der Regeneration

1. Zellentwicklung und Nährlösung

1.1 Zellentwicklung

Unsere weiteren Untersuchungen beziehen sich nun insbesondere darauf, wie die geschädigten Zellen nach einer bestimmten Übergangsphase allmählich zu normalen grünen Zellen regenerieren. In allen Fällen dient eine Synchronkultur als Vergleich.

Unter den angegebenen Kulturbedingungen vermehrt sich Chorella innerhalb eines Zyklus um das Zwanzigfache (vgl. RUPPEL 1962, LORENZEN and HESSE 1974). Während der Lichtzeit bleibt die Zellzahl in einer Synchronkultur konstant, erst in der 6.

Dunkelstunde (20. Std des Zyklus) beginnt eine schubartige Freisetzung der Autosporen, die nach 2 Std (22. Std) abgeschlossen ist. Die Dauer der Freisetzung ist ein Indikator für die Synchronisationsschärfe der Kultur. Während der zweistündigen Freisetzung steigt die rel. ZZ von 100 auf 2000 und bleibt dann bis zum Zyklusende konstant (Abb. 25). Mehr als 98 % aller Mutterzellen beteiligen sich an dieser Freisetzung, die Kultur ist vollsynchron. Ähnliche Ergebnisse liegen für andere synchronisierte einzellige Grünalgen wie Chlamydomonas, Scenedesmus oder Ankistrodesmus vor.
Gelegentlich ist die Autosporenfreisetzung nach 2 Std noch nicht abgeschlossen; unkontrollierbare Faktoren können zu einer Verringerung der Synchronisationsschärfe führen. Eine verringerte Autosporenzahl pro Mutterzelle ist meist auf

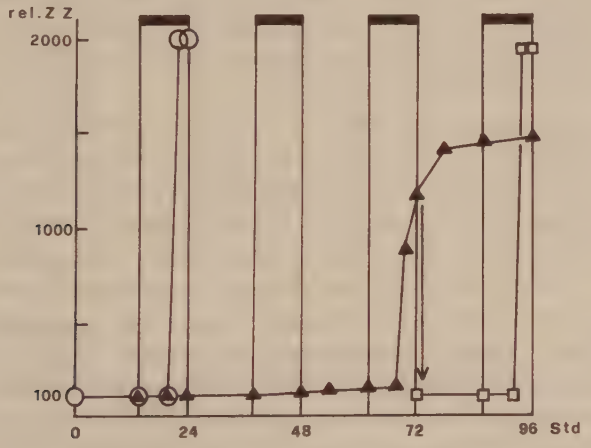

Abb. 25: Verlauf der rel. ZZ von Chlorellakulturen im normalen Synchronzyklus, nach Kälteschock (2 Std 4,5°C) und in der Regeneration.

○——○ Normal

▲——▲ Schock und Regeneration unverdünnt

□——□ Regeneration, zu Lichtbeginn (72. Std) auf rel. ZZ 100 verdünnt.

nicht ausreichende Verdunklung während der vorangegangenen Dunkelzeit zurückzuführen (s. S.47), wodurch der endogene Rhythmus der Zelle und damit ihre optimale Leistungsfähigkeit gestört wird (HESSE 1972).
Kältegeschockte Algen bleiben in ihrer Größe zunächst konstant. Eine Freisetzung von Autosporen in der folgenden Dunkelzeit unterbleibt, nur gelegentlich finden sich vereinzelt Autosporen. Am Ende des LDW sind die Zellen weiß und in ihrer Größe annähernd vergleichbar mit Zellen aus der 6. Lichtstunde. Ähnlich wirken tiefe Temperaturen auf die Zellentwicklung bzw. Freisetzung von Autosporen auch in nicht synchronen Chlorella-Kulturen (MÜNTZ 1967). Schädigungen in der Struktur der Zellen sind lichtmikroskopisch nicht deutlich zu erkennen. Im Verlaufe der zweiten Lichtzeit bleiben die Zellen in Anzahl, Form, Größe und Farbe weitgehend unverändert; allerdings können vereinzelt Autosporen auftreten. Nach 48 Std finden sich in der Masse der großen und "weißen" Zellen einzelne, die größer und schon hellgrün gefärbt sind. Mit Beginn des dritten LDW setzt eine deutliche Regeneration ein: nach 6 Std (54. Std) sind die meisten Zellen deutlich grün und weitere Autosporen werden freigesetzt (rel. ZZ 120). Die Kultur ist am Ende der 3. Lichtzeit uneinheitlich: neben grünen Zellen verschiedener Größe kommen auch vereinzelt kleine schwach grüne Zellen vor, die offensichtlich stärker geschädigt sind. In der 20. Std des 3. LDW setzt ein deutlicher Freisetzungsschub ein, der nach 2 Std noch nicht abgeschlossen ist. Am Ende dieser Dunkelzeit liegen dennoch nur noch wenige ungeteilte Mutterzellen vor, die jungen Autosporen weisen zu solchen aus einer Normalkultur keinen Unterschied in der Färbung auf. In einem weiteren LDW wachsen diese Zellen gleichmäßig bis zu einer mittleren Größe heran, können aber wegen der zu hohen Ausgangsdichte und vielleicht auch wegen einer inzwischen eintretenden Nährstoffverarmung im 4. LDW nicht mehr die normale Größe der Mutterzellen erreichen und auch keine Autosporen freisetzen. Verdünnt man hingegen zu Beginn des 4. LDW auf die normale Ausgangszellzahl (rel. ZZ 100), so erhält man an dessen Ende eine vollsynchrone Kultur mit an-

nähernd rel. ZZ 2000. An der Zellvermehrung sind alle Zellen beteiligt, eine Selektion findet nicht statt. Während des gesamten Verlaufs vom Beginn des Ausbleichens bis zur vollendeten Regeneration treten in der Kultur keine Leichen auf. Durch den zweistündigen Standard-Schock werden also keine Algen getötet; der Schädigungsgrad der einzelnen Algen ist allerdings unterschiedlich, wie sich aus der Dauer des Wiedergrünens ersehen läßt. Dies liegt sicher mit daran, daß der spezielle Entwicklungszustand der Algen in einer Synchronkultur durchaus variiert.
Liegt in einer Kultur aufgrund unkontrollierbarer Faktoren eine geringere Synchronisationsschärfe vor, dann treten die Schockwirkungen im verminderten Maße auf, die Algen bleichen nicht völlig aus und die Regeneration beginnt schon im 2. Zyklus (vgl. LORENZEN 1963). Im Grad der Schädigung der Zellen treten deutliche Unterschiede auf. Ein Teil der Algen - mit geringerer Schädigung - beginnt bereits im 2. Zyklus mit dem Wachstum. Eine ähnliche Erscheinung ist zu beobachten, wenn man die Schädigung durch Reduktion der Schockdauer auf 90 Min verringert.
Schließlich muß noch erwähnt werden, daß kältegeschockte Algen, die völlig regeneriert sind und wieder synchron wachsen, nach erneutem Kälteschock in der kritischen Phase wiederum völlig ausbleichen. Eine Abhärtung findet also nicht statt.

1.2 Nährlösung

Die experimentellen Bedingungen im Verlaufe der Regeneration könnten zu einer Verarmung der Nährstoffe führen, die die Schockwirkung überlagern würde. Diese Vermutung wurde experimetell widerlegt: die Nährlösung (NL) nach KUHL (1962) ist so konzentriert, daß sie erst nach längerer Kulturdauer verarmt. Der pH-Wert der NL steigt innerhalb eines LDW von 5,6 auf 6,6. Nach dem Schock bleibt der pH-Wert konstant bei etwa 6,0. Eine kältebedingte Veränderung der Zellmembran wirkt sich möglicherweise so aus, daß jede weitere Aufnahme von Mineralien aus dem Medium verhindert wird. Im Verlauf des dritten Zyklus steigt der pH-Wert dann wieder deutlich.

Ein Wechsel der NL vor dem Schock (6. Std), direkt nach dem Schock (8. Std) oder am Ende des 1. LDW (24. Std) ist weder für die Schockwirkung noch für die Regeneration von Bedeutung. Eine Normalkultur wächst in der abzentrifugierten NL einer Schock-Kultur aus der 8. oder 24. Std ebenso normal und ist weder in der Produktion noch in der Synchronisation beeinträchtigt. Eine Nährstoffverarmung oder das Ausscheiden von Giftstoffen als Folge des Schocks kann also ausgeschlossen werden. Andere zelluläre Ausscheidungen der Algen in das Medium, wie sie verschiedentlich nach Kältebehandlung beobachtet wurden (MÜNTZ 1967), sind durchaus möglich aber für Ausbleichen und Regeneration ohne Bedeutung.

In einzelnen Fällen machte sich das Abzentrifugieren der Zellen unmittelbar vor bzw. nach dem Schock negativ bemerkbar, indem die Zellen nach Überführen in das neue Medium nicht mehr einzeln suspendierten, sondern leicht geklumpt blieben. Dementsprechend war der Lichtgenuß der Zellen während des Schocks bzw. danach nicht gleichmäßig maximal, was zu einer deutlichen Verminderung der Schockwirkung führte.

2. Kohlenhydrate, Protein, Trockengewicht, Lipide

2.1 KH, Pr, TG

Die Entwicklung von KH, Pr und TG von Chlorella im normalen Synchronzyklus, nach dem Schock und in der Regeneration ist in Abb. 26 und 27 wiedergegeben. Die Werte für die Normalkultur entsprechen den bereits bekannten Ergebnissen von Untersuchungen an synchronisierten Grünalgen (RUPPEL 1962, SENGER 1970 a). Alle Parameter steigen im Verlaufe des Normalzyklus um den gleichen Faktor (20fach); dies ist die Voraussetzung für Dauersynchronisation (LORENZEN und SCHLEIF 1966) und beweist die optimale Koordinierung aller Wachstumsprozesse in der Zelle. Der starke Umsatz von KH in Pr sowie der schwache Abfall von TG während der Dunkelzeit sind Charakteristika in der Entwicklung synchronisierter Grünalgenkulturen, die bereits ausführlich diskutiert wurden (u.a. RUPPEL 1962, SENGER 1970 a).

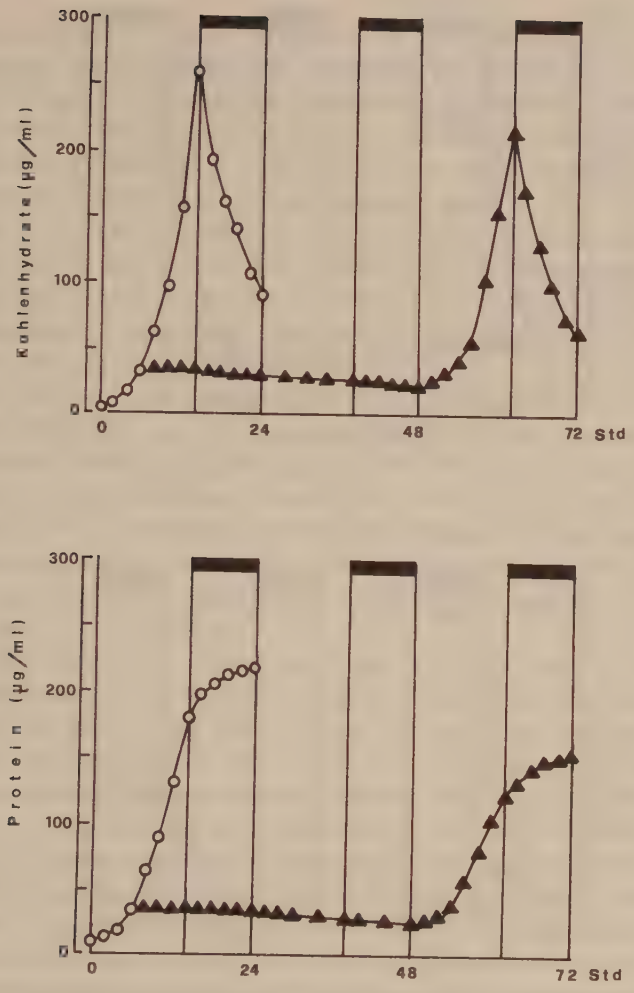

Abb. 26: Kohlenhydrat- (oben) und Proteingehalt (unten) von Chlorella im Verlauf eines Synchronzyklus ○——○ und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C) bzw. in der Regeneration ▲——▲ .

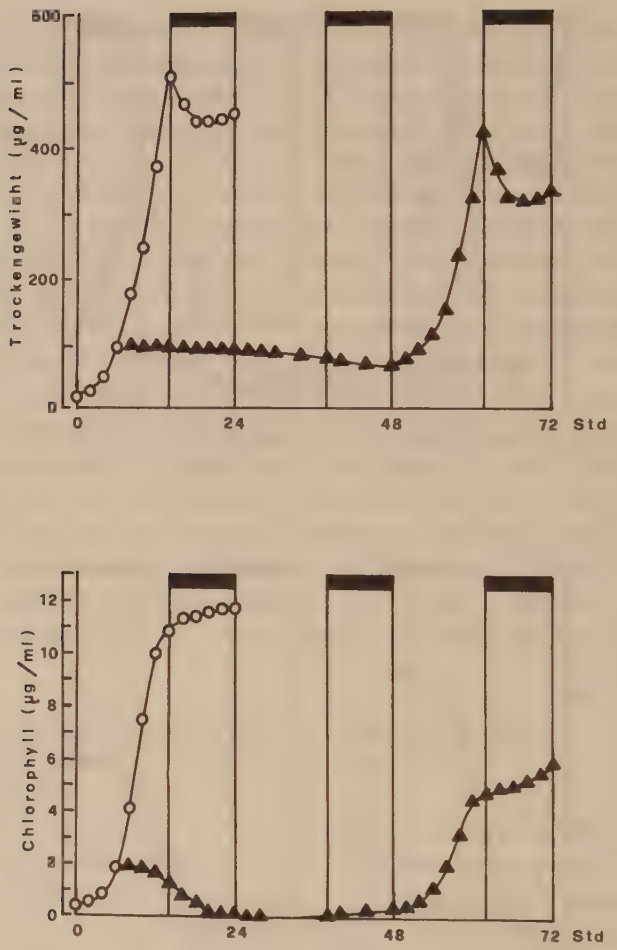

Abb. 27: Trockengewicht (oben) und Gesamtchlorophyllgehalt (unten) von Chlorella im Verlauf eines Synchronzyklus o——o und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C) bzw. in der Regeneration ▲——▲.

Nach dem Schock (8. Std) bleiben die Werte für KH, Pr und TG zunächst über mehrere Std konstant und fallen dann während der Dunkelzeit bis zum Zyklusende schwach ab. Dieser Abbau ist für KH (16 %) und TG (9 %) deutlich stärker als für Protein (3 %). Im 2. LDW setzt sich diese Entwicklung für alle 3 Parameter gleichmäßig fort; nach 48 Std ist der Gehalt für KH, Pr und TG auf 2/3 abgefallen. Dieser Verlust ist einmal durch die - wenn auch im abgeschwächten Maße - ablaufende Atmung zu erklären, zum anderen ist auch ein Ausscheiden von Stoffen in das Medium infolge Kälteschocks möglich (vgl. MÜNTZ 1967).
Mit Beginn des 3. Zyklus fängt für KH, Pr und TG die sichtbare Regeneration an. Der Anstieg von KH in den ersten Lichtstunden ist schneller als der für Pr und TG, was der normalen Zellentwicklung entspricht. Nach 72 Std ist die Produktion im Vergleich mit einer Normalkultur zwar geringer, der Verlauf der einzelnen Parameter ist jedoch schon weitgehend normalisiert. Eine optimale Koordinierung ist allerdings noch nicht erreicht.
Dauerlicht oder Dauerdunkel nach dem 1. LDW führen zu keiner Regeneration. In solchem Fall bleiben die Algen ungleichmäßig groß, weiß und sterben im Laufe der Zeit ab. Das mikroskopische Bild läßt dann deutlich die Auflösung der Zellkonturen erkennen. Ein Wechsel von Licht und Dunkel ist also nicht nur für die Normalzelle optimal, sondern für eine Regeneration der kältegeschockten Zellen notwendig. In diesem Zusammenhang muß noch erwähnt werden, daß eine Regeneration der Zellen nach dreistündigem Kälteschock sehr viel langsamer und vor allem nicht vollständig erfolgt. Im Gegensatz zum zweistündigen Standard-Schock findet man in dieser Kultur auch im LDW immer einen Anteil von abgestorbenen Zellen.

2.2 Lipide

Die tiefgreifenden Veränderungen im Pigmenthaushalt von Chlorella als Folge des Kälteschocks und in der photosynthetischen Kapazität werfen die Frage auf, inwiefern auch die Chloroplastenmembranen geschädigt werden, zumal über Strukturveränderungen an Membranen als Folge von tiefen Tempera-

turen schon berichtet wurde (u.a. SPETH and WUNDERLICH 1973, KIMBALL and SALISBURY 1973). Eine Untersuchung der Lipide sollte darüber Auskunft geben. Die wichtigsten polaren Lipide, die bei Chlorella pyrenoidosa gefunden wurden,sind:

1. Glycolipide:	Monogalaktosyldiglycerid	MGDG
	Digalaktosyldiglycerid	DGDG
	Sulfoquinovosyldiglycerid	SL
1. Phosphatide:	Phosphatidylglycerin	PG
	Phosphatidylcholin (Lecithin)	PC

Tab. 13

Relative Fettsäureverteilung (in %) auf polare und apolare Lipide in einer Normalkultur (24. Std), einer Schockkultur (24. Std) und in einer regenerierenden Kultur (56. Std) von Chlorella

	Normal	Schock	Regeneration
polare Lipide (gebundene FS)	94,5	59,4	71,9
apolare Lipide (freie FS und Neutralfette)	5,5	40,6	28,1
gebundene FS / freie FS	17,2	1,5	2,6

Die Untersuchung der Verteilung der Gesamtfettsäuren auf die polaren Lipide (gebundene FS) einerseits und die apolaren Lipide (freie FS und Neutralfette) andererseits ergab eine Zusammensetzung,wie sie in Tab. 13 dargestellt ist. Da in unserem Falle in den apolaren Lipiden der Anteil der freien FS gegenüber den Neutralfetten weit überwiegt, wurden die Neutralfette (Mono-,Di- und Triglyceride) vernachlässigt,so daß man das Verhältnis der (in polaren Lipiden) gebundenen zu den freien FS aufstellen kann. Auffällig ist die Verschiebung des Fettsäuregehaltes durch die Schockwirkung zugunsten der freien FS und die rückläufige Erscheinung in der Regeneration. Der Quotient gebundene FS/freie FS zeigt, daß infolge Kälteschock

Tab. 14

Verteilung der einzelnen FS (in % der Gesamt FS) bei Normal-, Schock- und Regenerationskultur von Chlorella

	Normal			Schock			Regeneration		
FS	geb.	frei	total	geb.	frei	total	geb.	frei	total
C 14:0	8,5	5,0	13,5	19,0	36,0	55,5	62,0	23,0	85,0
C 16:0	20,0	--	20,0	15,0	1,0	16,0	--	2,5	2,5
C 16:1	2,0	--	2,0	1,0	1,0	2,0	--	--	--
C 16:2	3,0	--	3,0	1,0	--	1,0	0,5	0,5	1,0
C 16:3	6,5	--	6,5	2,0	--	2,0	0,5	--	0,5
C 18:1	9,5	--	9,5	3,5	0,5	4,0	1,5	1,0	2,5
C 18:2	9,5	--	9,5	5,5	2,0	7,5	1,0	1,0	2,0
C 18:3	33,0	--	33,0	12,5	1,0	13,5	5,0	1,0	6,0
andere			3,0			9,0			5,0
gesättigte FS/ ungesättigte FS			0,5			2,3			7,0

FS freigesetzt und im Zuge der Regeneration wieder eingebaut werden.

Die Auftrennung, Identifizierung und quantitative Analyse der einzelnen FS im Gaschromatographen ergab weitere Einblicke in die Wirkung des Kälteschocks (Tab. 14). Die als Folgen des Schocks auftretenden Verschiebungen von längerkettigen FS (C 18:1, C 18:2, C 18:3) zu kürzerkettigen FS (C 14:0) einerseits und von den gebundenen zu den freien FS spricht für eine Freisetzung und den Abbau von FS infolge Schockwirkung. Diese Tendenz hält noch über längere Zeit an, so daß sie zum Zeitpunkt der beginnenden Regeneration (56. Std) noch deutlicher geworden ist. Möglicherweise werden abbauende Enzyme (z.B. Galactolipasen), die im normalen Thylakoid latent vorliegen, durch die Schockbehandlung aktiviert und führen dann zum verstärkten Auftreten von freien FS (HELMSING 1969). Auch im Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten FS macht sich

eine deutliche Verschiebung bemerkbar, die über den 1. Zyklus (24. Std) hinaus anhält. Offenbar sind es die ungesättigten, längerkettigen FS, die gegenüber der Schockbehandlung besonders sensibel sind.
Ähnliche Ergebnisse für vergleichbare Temperaturen finden sich bei PATTERSON (1970), der den Einfluß der Kulturtemperatur auf die Zusammensetzung der FS bei Chlorella untersuchte: hohe Anteile von C 16:0, C 16:3 und C 18:3, geringere Anteile bzw. nur Spuren von C 16:1, C 16:2 und C 18:0.
Im Gegensatz dazu fanden WUNDERLICH et al. (1973) eine starke Zunahme der ungesättigten FS bei Tetrahymena nach langfristi-Abkühlen bis 24 Std auf 10° C. Dies scheint jedoch mit einer Adaptation der Zellen an die tiefe Temperatur verbunden zu sein, wie sie bei Chlorella unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht vorkommt (vgl. Kap.I). Die Autoren folgern, daß die strukturelle Wiederherstellung der Membranen bei Tetrahymena nach der Kältebehandlung mit der Desaturierung der FS parallel läuft.

Tab. 15

Veränderungen der relativen Linolensäurekonzentration (in % der totalen FS) in Galaktolipiden und Phospholipiden bei Chlorella in Normal- und Schockkultur (24. Std) bzw. in der Regenerationskultur (56. Std)

	Normal	Schock	Regeneration
Galaktolipide (MGDG + DGDG)	22,6	11,2	4,4
Phospholipide	10,4	1,3	0,6

Häufigste FS bei Chlorella ist die Linolensäure (C 18:3); sie unterliegt durch Schock und Regeneration starken Schwankungen, so daß ihre Verteilung in den für die Thylakoide typischen Galaktolipiden von großem Interesse ist. Das Ergebnis aus Tab. 15 bestätigt die vorangegangenen Untersuchungen und beweist zugleich, daß der Kälteschock in den Chloroplastenmembranen starke Veränderungen hervor-

ruft. Da bei der Neusynthese höher ungesättigte FS (wie etwa C 18:3) zunächst nur langsam in die Fette eingebaut werden (HAWKE et al. 1974), können die Werte für die C 18:3 - Verteilung zur 56. Std - auch im Sinne einer langsameren Regeneration gedeutet werden.

Die Effekte des Kälteschocks ähneln der von HARNISCHFEGER (1972) beschriebenen Wirkung einer osmotischen Desintegration der Membranlipide von Chloroplasten. Lichtenergie, die von den akzessorischen Pigmenten aufgenommen aber nicht auf gewohntem Wege an die photosynthetischen Reaktionszentren weitergegeben werden kann, sensibilisiert bestimmte Verbindungen, die ihrerseits sekundär den photosynthetischen Apparat inaktivieren. Diese Inaktivierung läuft parallel mit der Oxidation und dem Abbau langkettiger ungesättigter FS, die während der Desintegration frei werden. Es wird angenommen, daß ein Abbauprodukt dieser FS, möglicherweise Malondialdehyd, als Hemmstoff für den Elektronen-Transport wirkt. Neuere Untersuchungen (HOSHINA et al. 1975) schreiben die photochemische Inaktivierung dem während der Lichtalterung der Chloroplasten durch Hydrolyse aus Lecithin gebildeten Lysolecithin zu.

Die vorliegenden Ergebnisse über die Wirkung des Kälteschocks - Freisetzung von FS, Abbau längerkettiger FS, Bedeutung des Lichtes, Hemmung der Photosynthese u.a. - stehen in keinem Widerspruch zu dem von HARNISCHFEGER (1972) beschriebenen Wirkungsschema. Da bei Desintegration von Chloroplasten größere Mengen von Galaktolipiden und Pigmenten freigesetzt werden (HEISE 1972) kann damit auch die hohe Pigmentempfindlichkeit der kältegeschockten Algen erklärt werden. Pigmentmoleküle, die aus ihrem natürlichen Verband herausgelöst sind, sind leichter zu sensibilisieren.

Diese Überlegungen aufgrund unserer FS-Analysen müssen insofern eingeschränkt werden, als es sich hier im Vergleich zu den isolierten Chloroplasten um ganze Zellen handelt, so daß bei den FS-Analysen nicht nur die Chloroplastenlipide erfaßt werden. Da aber die Galaktolipide nur für Thylakoidmembranen typisch sind (BENSON et al. 1959, SUMIDA et al. 1975) und sich wesentliche Schockwirkungen im Chloroplasten von Chlorella abspielen (Pigmente, Photosynthese), dürften die vor-

liegenden Veränderungen in der Zusammensetzung der PS weitgehend auf Vorgängen im Chloroplasten beruhen.

3. Pigmente

Das starke Ausbleichen der Algen war stets der Indikator für die Auswirkungen des Schocks. Neben der Zell- und Sauerstoffentwicklung wurde immer der Gesamtchlorophyllgehalt als Maßstab für die Sensibilität der Algen angesehen. Über die übrigen Pigmente wurde bisher keine Aussage gemacht, obwohl auch sie von der Schädigung stark betroffen sein müssen. Chlorophyllverlust bei Belichtung mit hohen Intensitäten wird unter dem Begriff "photobleaching" beschrieben (u.a. AACH 1953, MARVIN III and KARLANDER 1974). Aber nicht nur bei den Chlorophyllen, auch bei den übrigen Pigmenten werden Schwankungen im Gehalt in Abhängigkeit vom Licht und anderen Außenfaktoren registriert (HAGER 1957 b, 1967, 1970, 1975). Im Hinblick auf die unterschiedlichen Funktionen der Pigmente als photosynthetisch aktiv, akzessorisch oder als Schutzpigment ist es besonders wichtig, die einzelnen Pigmente im Entwicklungszyklus der Algen und nach Kältebehandlung zu untersuchen. Hinweise über mögliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung bzw. ihrer Sensibilität gegenüber der Schockwirkung haben bereits die Spektren der Gesamtpigmentextrakte (Kap. I) gegeben.
Die Pigmentverhältnisse im Synchronzyklus von Chlorella und nach Schockbehandlung sind in Abb. 28 wiedergegeben. Alle Pigmente bzw. Pigmentgruppen zeigen im Normalzyklus einen S-förmigen, erst langsamen, dann stärkeren und während der Dunkelzeit wieder schwächeren Anstieg, wie er bereits von RUPPEL (1962) für Chlorella oder SENGER (1970 a) für Scenedesmus beschrieben wurde. Während des Schocks und unmittelbar danach bleibt der Gehalt der Pigmente konstant, dann folgt ein mehr oder weniger schneller Verlust, der sich auch in der Dunkelzeit fortsetzt. Setzt man die einzelnen Pigmente oder Pigmentgruppen zueinander ins Verhältnis wie in Abb. 29, so ergibt sich für die Normalkultur eine gewisse Tendenz: Alle Kurven weisen im Bereich um die 4. bis 6. Std des Zyklus

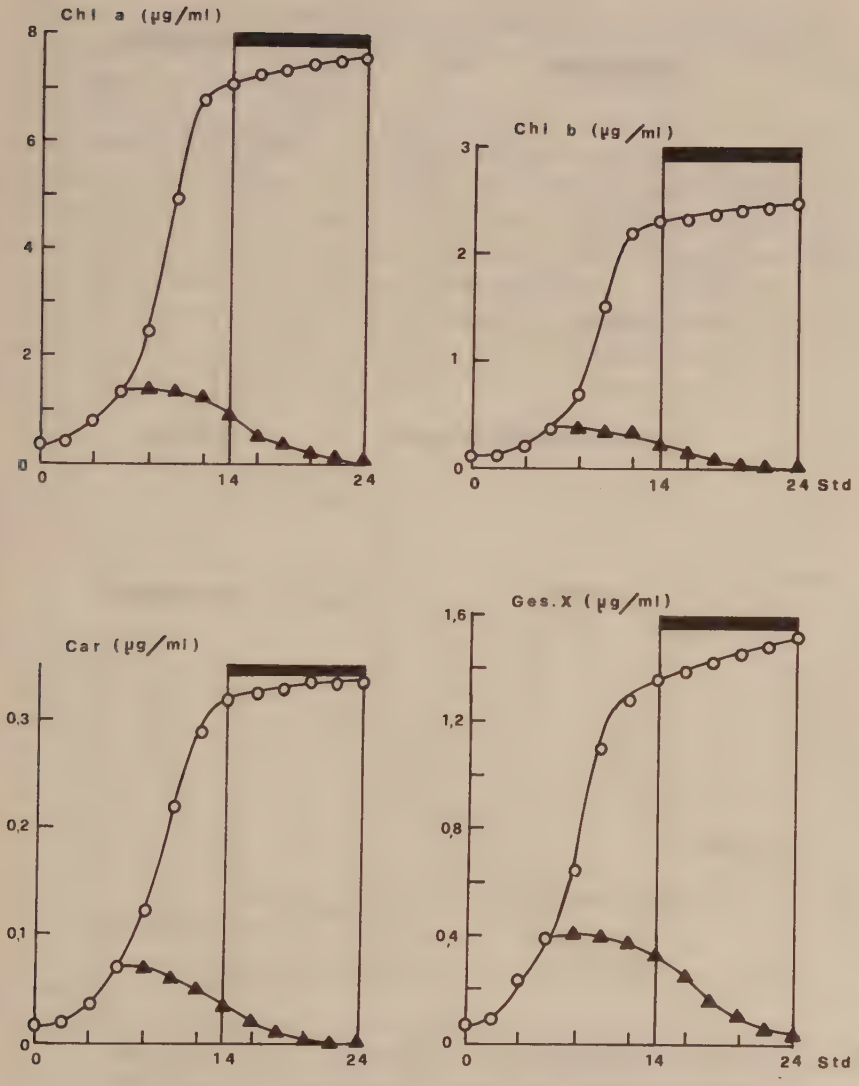

Abb. 28: Pigmentgehalt von Chlorella im Verlauf des Synchronzyklus und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C).

o——o Normal

▲——▲ Kälteschock

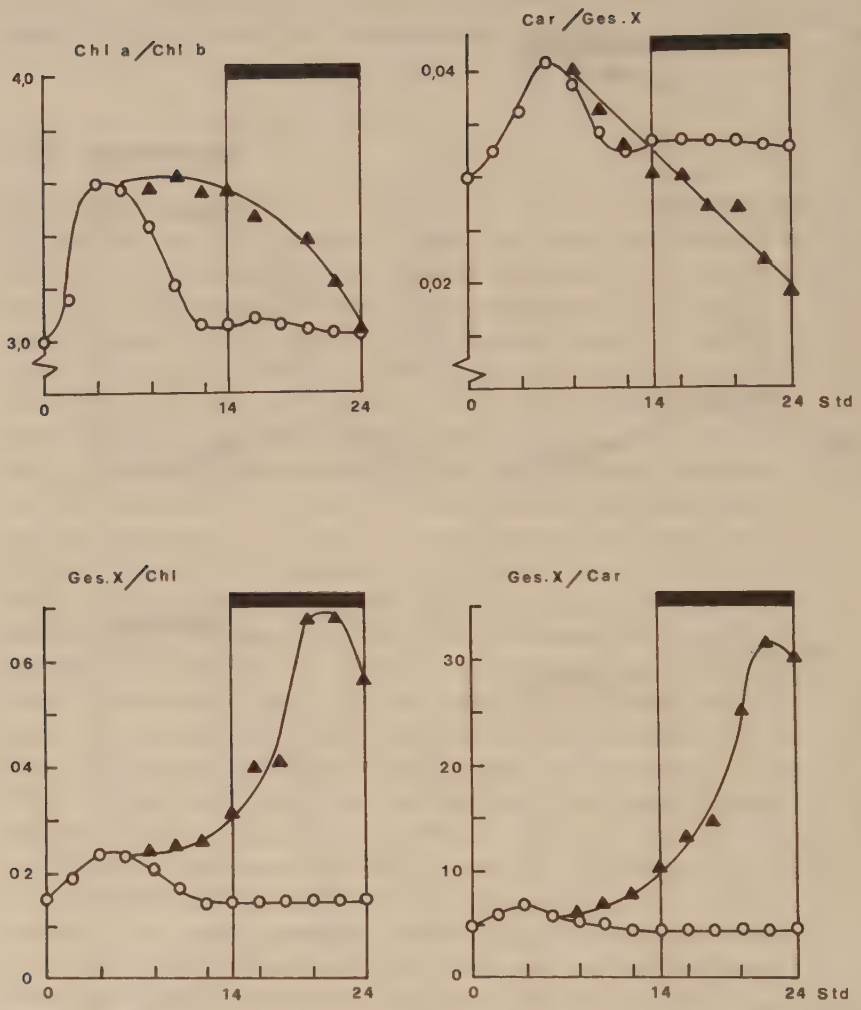

Abb. 29: Pigmentverhältnisse von Chlorella im Verlauf des Synchronzyklus und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C).

O—O Normal

▲—▲ Kälteschock

ein mehr oder weniger deutliches Maximum auf, fallen dann wieder ab und bleiben während der Dunkelzeit konstant. Einen ähnlichen Verlauf fanden wir bereits bei der Kurve der Sauerstoffentwicklung (Abb. 19).
Starke Abweichungen von diesem Verlauf treten bei den kältegeschockten Algen auf, die auf einer unterschiedlichen Schädigung der Pigmente beruhen. Eine Reihenfolge, die sich bereits aus Abb. 29 ersehen läßt, wird besonders in Abb. 30 verdeutlicht. Vergleicht man den prozentualen Pigmentverlust nach dem Schock in Abhängigkeit von der Zeit, so erkennt man, daß Carotin zuerst und am stärksten abgebaut wird. Dann folgen die Chlorophylle a und b, wobei zwischen beiden kein

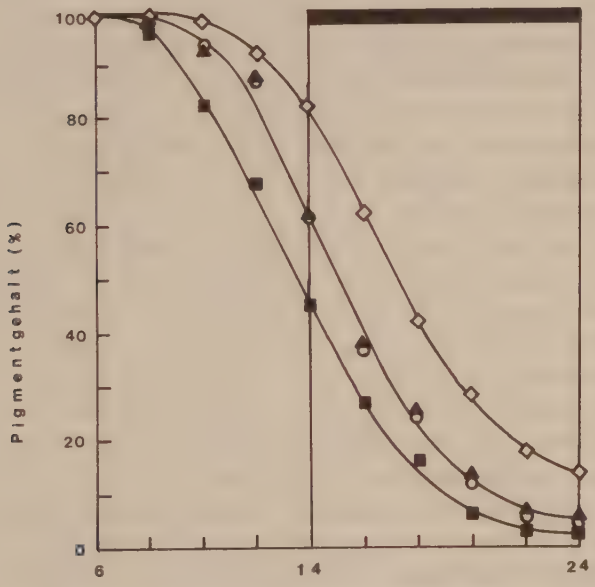

Abb. 30: Prozentualer Pigmentverlust nach dem Kälteschock (2 Std 4,5°C). Pigmentgehalt vor dem Schock (6.Std) = 100%.

○—○ Chlorophyll a
▲—▲ Chlorophyll b
■—■ Carotin
◇—◇ Gesamtxanthophyll

Unterschied in der Schädigung zu bemerken ist. Der geringste Einfluß durch die Kälte ergibt sich für die Xanthophylle. Ihr Abbau setzt deutlich verspätet ein und ist nach 24 Std noch nicht im gleichen Maße wie bei den übrigen Pigmenten fortgeschritten. Stark vereinfachend könnte man die Geschwindigkeit des Abbaus als Grad der Sensibilität ansehen. HAGER (1957 b, 1967) fand entsprechende Empfindlichkeiten sowohl bei Avena nach Behandlung mit 5° C und Licht - tiefe Temperaturen im Dunkel waren ohne Wirkung - als auch bei Chlorella bei Belichtung nach Erhitzen. Es muß aber hinzugefügt werden, daß die Verhältnisse sicher komplizierter sind, als sie sich hier darstellen. So ist bekannt, daß Violaxanthin im Starklicht reversibel oxidiert wird und dabei über Antheraxanthin in Zeaxanthin übergehen kann (HAGER 1967, 1975). Man könnte sich deshalb auch vorstellen, daß zuerst eine Oxidation der Carotine erfolgt, wodurch diese zunächst in der Analyse als Epoxide zusammen mit den anderen Xanthophyllen erfaßt werden; erst sekundär findet dann ein weiterer Abbau statt. Damit wäre auch die verzögerte Abnahme des Xanthophyllgehaltes zu erklären (Abb. 30).

Die Auftrennung der Chlorophylle kann die Vermutung, daß Absorptionsänderungen im kurzwelligen Bereich die Folge einer Änderung im Verhältnis Chl a / Chl b sind, nicht bestätigen. Für die Analyse mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie sind Pigmentkonzentrationen nötig, die im Falle der "völlig" ausgebleichten Algen nur durch sehr hohe Konzentrierung erhalten werden konnten. Der Methanol-Pigmentextrakt ist dann schmutzig graugrün bis braungrün. Die einzelnen Farbzonen sind nicht scharf getrennt; speziell bei den Chlorophyllen treten graugrüne Vor- und Nachzonen auf, deren Umfang mit zunehmender Schockwirkung ansteigt. Unterhalb der Chlorophyllzonen liegen die Chlorophyllide (HAGER 1957 b), während die Vorzonen Peroxidbildungen der Chlorophylle durch Oxidation mit Luftsauerstoff sind (HAGER 1957 a), die eine Verlagerung der Maxima im Blaubereich um 20 nm in den kurzwelligen Bereich des Spektrums zur Folge haben (STRAIN 1958, HAGER und MEYER-BERTENRATH 1966). Abweichend vom Normal mit Blaumaximum bei 440 nm und Schulter bei 410 nm hat dieser Bereich bei 410 nm das Hauptmaximum und bei 440 nm die Schulter.

Phäophytin führt ebenfalls zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von etwa 430 nm nach 410 nm (ZSCHEILE and COMAR 1941, SMITH and BENITEZ 1955) und so ist es nicht auszuschließen, daß sich unter den Abbauprodukten des Chlorophylls als Folge der Kältebehandlung auch Phäophytin befindet. Die beschriebenen Vor- und Nachzonen sind zwar nach HAGER (1957 a, 1957 b) bei normalen Zellen eine Folge der Methode der Dünnschichtchromatographie, da die Verschiebun- im Spektrum in unserem Fall bei kältegeschockten Algen aber verstärkt auftreten, muß die Ursache dafür in den im Zuge des schockbedingten Chlorophyllabbaus gebildeten Peroxiden oder Phäophytin liegen.
Zusätzlich wurde der Verlauf der einzelnen Pigmente bei veränderten Schockbedingungen untersucht. Tab. 16 gibt den Gehalt der Pigmente nach 24 Std an. Wie zu erwarten, schützt Verdunklung oder Stickstoffbegasung alle Pigmente vor völligem Abbau.

Tab. 16

Pigmentmengen in µg/ml Suspension am Ende des Zyklus bei unterschiedlicher Behandlung

Behandlung in der 7. und 8. Std	Chl a	Chl b	Carotin	Gesamtxanthophylle
Normal	7,7	2,5	0,34	1,54
Kälte-Licht	0,08	0,03	0,002	0,06
Kälte-Dunkel	4,7	1,6	0,3	1,3
Kälte-Licht-Stickstoff	4,5	1,5	0,2	1,0

Tab. 17 gibt die Pigmentwerte und ihre Verhältnisse während der Regeneration der Kultur wieder und zwar zu Beginn des 3. Zyklus (48. Std) nach 4 Lichtstunden (52. Std) und am Ende des 3. Zyklus (72. Std). In der Reihenfolge der Regeneration ist keines der Pigmente besonders bevorzugt. GRIMME und PORRA (1974) beschreiben das Wiederergrünen von synchro-

nen Chlorella-Kulturen nach Stickstoffmangel und finden deutliche Unterschiede in der Synthese zu Beginn zugunsten des Chlorophyll a. Das Verhältnis Chl a / Chl b steigt in den ersten 12 Std von 1,8 auf 3,6. Wie aus Abb. 29 sowie aus Tab. 17 ersichtlich ist, ist die Bevorzugung des Chl a zu Beginn einer Neusynthese allerdings keine spezielle Folge einer vorangegangenen Stickstoffmangel- oder Kältebehandlung. Auch in der Normalkultur steigt - ebenso wie in der "normal" reagierenden Regenerationskultur - zu Beginn der Lichtzeit das Chl a / Chl b-Verhältnis bis zu einem Maximum in der 4. Lichtstunde stark an.

Tab. 17

Pigmentgehalt (in µg/ml Suspension) und Verhältnisse der Pigmente von Chlorella während der Regeneration

	48. Std	52. Std	72. Std
Chl a	0,26	0,44	4,42
Chl b	0,09	0,13	1,48
Car	0,01	0,02	0,186
Ges.X	0,06	0,13	0,89
Chl a / Chl b	2,8	3,38	3,0
Car / Chl	0,028	0,038	0,031
Ges.X / Chl	0,17	0,23	0,15
Ges.X / Car	6,0	6,5	4,8

Im Vergleich mit den Werten von KH, Pr und TG kann man nicht nur nach dem Schock bei den Pigmenten einen schnelleren und stärkeren Abbau beobachten, sondern auch eine schnellere Neusynthese in der Regeneration. Während KH, Pr und TG bis zur 48. Std abnehmen und erst mit Beginn des 3. Zyklus wieder eine Nettosynthese zu verzeichnen ist, liegt der Beginn der Neusynthese für die Pigmente bereits im 2. Zyklus: zur 48. Std sind sie schon wieder im schwachen Maße gebildet (Tab. 17). Ihr prozentualer Anstieg in den ersten Stunden der 3. Lichtzeit ist wiederum stärker als bei KH, Pr und TG, was gleichfalls den Verhältnissen in einer Normal-

kultur entspricht. Am Ende des 3. Zyklus liegt eine Kultur vor, die in der Zusammensetzung der Pigmente weitgehend der Normalkultur entspricht.

Tab. 18

Chlorophyllgehalt von Chlorella-Kulturen nach Kälteschock in der empfindlichen Phase mit Zwischenschaltung eines Filters aus Carotinoid-Lösung

Dauer der Kältebehandlung	Chlorophyllgehalt nach 24 Std (µg/ml Susp.)	
	mit Filter	ohne Filter
0 Std (Normal)	--	11,16
2 Std	1,4	0,63
3 Std	1,1	0,06

Es gibt Carotin-Mangel-Organismen, deren aerobe Lichtempfindlichkeit dadurch verhindert werden kann, daß man Filter aus Carotinpigmenten zwischen die Zellen und das Licht stellt (KRINSKY 1968). Daraus läßt sich ableiten, daß die als Schutz dienenden Pigmente eine mögliche schädliche Strahlung herausfiltern. Diese Hypothese wurde am Beispiel des Kälteschocks von Chlorella überprüft: Während der Kältebehandlung wurde zwischen Lichtquelle und Kulturröhre ein Glasgefäß mit einer carotinhaltigen Lösung deponiert und auf gleiche Lichtintensität eingestellt. Der Versuch wurde sowohl mit einer wäßrigen Lösung aus Karotten (Daucus carota) wie auch mit einer methanolischen Lösung von Carotinoiden, die aus Stickstoffmangelkulturen von Chlorella gewonnen wurde (GALLING 1963), durchgeführt und brachte das gleiche Ergebnis. Wie aus Tab. 18 hervorgeht, kann man dem Carotinoidfilter nur eine beschränkte Schutzfunktion zuschreiben. Eine andere Tatsache aber bestätigt die besondere Bedeutung der Carotinoide als Schutzpigmente. Vergleicht man nämlich die Pigmentspektren dieser Kulturen (Abb. 31), so findet man eine Verschiebung des Maximums im blauen Spektralbereich nur bei der Kultur ohne Carotinfilter. Offenbar haben hier die im flüssigen

Filter befindlichen Pigmente einen Anteil von schädigendem Licht herausgefiltert. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse mit Farblicht (Kap. I, 4) und der Pigmentauftrennung kann man wohl auch bei Chlorella den Carotinoiden (Carotinen und Xanthophyllen) eine gewisse Schutzfunktion zuschreiben. Aber auch die Carotinoide selbst müssen geschützt werden; es sind wahrscheinlich Proteine, die dabei einer oxidativen Schädigung entgegenwirken (SIRONVAL and KANDLER 1968). Deshalb ist es denkbar, daß die Kälteeinwirkung auf Chlorella über die Strukturveränderungen in den Membranen und damit in den Proteinpigmentkomplexen, zuerst die Carotine schädigt, wodurch

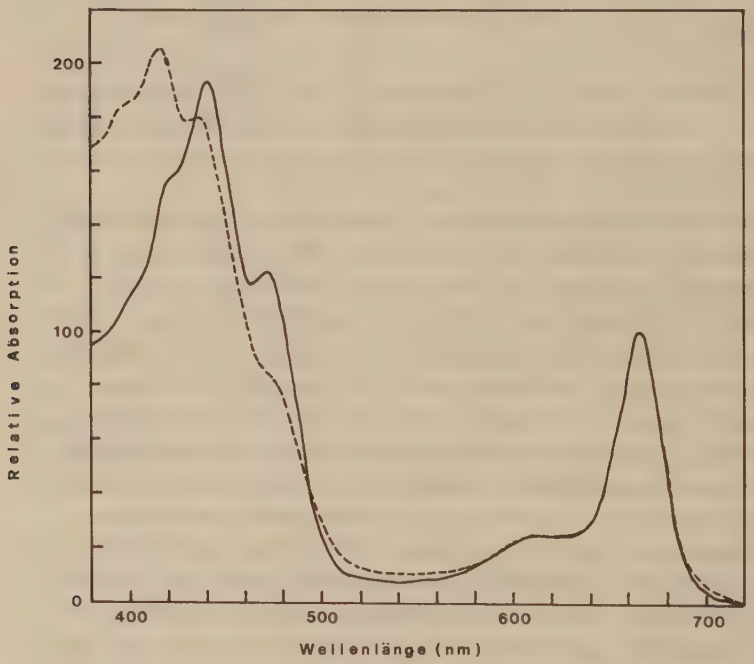

Abb. 31: Schutzwirkung des Carotins.
Absorptionsspektren von Pigmentextrakten aus kältegeschockten Chlorellakulturen.
---- 3 Std 4,5°C,Licht
—— 3 Std 4,5°C,Licht mit "Carotinfilter".
Die Kurven wurden normalisiert: $A_{665} = 100, A_{720} = 0$.

diese photooxidativ zerstört werden und dann sekundär auch die Chlorophylle betroffen sind, u.a. weil ihnen kein Schutz mehr durch die Carotinoide zuteil wird.

4. Photosynthese, Atmung

Ebenso wie für andere physiologische Reaktionen ist seit langem bekannt, daß auch Photosynthese und Atmung vom Entwicklungszustand der grünen Zelle bestimmt werden (NIHEI et al. 1954, SOROKIN 1957, LORENZEN 1959). Diese Ergebnisse bestätigen zugleich, daß die Bedingungen im LDW den"natürlichen" Bedürfnissen der Algen entsprechen.

4.1 DCMU-Hemmung

Parallel zur Photosynthese wurde auch die Atmung im Licht bestimmt (Zusammenfassung über Atmung s. EGLE 1960). Die Verwendung von DCMU zur Ausschaltung der Photosynthese am PS II stößt jedoch bei Anwendung auf Algen im Synchronzyklus auf Schwierigkeiten, da sowohl die Aktivität von PS II (SENGER and BISHOP 1969, NELLE et al. 1975) als auch die Hemmung der Photosynthese durch DCMU (FRICKEL-FAULSTICH und SENGER 1972) mit dem Zellalter starken Schwankungen unterliegt. Abb. 32 gibt die Photosynthesehemmung von drei verschiedenen Entwicklungsstadien in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration wieder. In der 17. Std ist eine totale Hemmung auch mit höheren DCMU-Konzentrationen (4×10^{-5} molar) nicht möglich. In Abb. 33 ist der Verlauf der prozentualen Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung durch DCMU mit zwei verschiedenen Konzentrationen über den ganzen Entwicklungszyklus von Chlorella dargestellt. Deutlich ist zu sehen, daß die Hemmung für beide Konzentrationen in der Mitte der Dunkelzeit bis zur 20. Std am geringsten ist. Erst mit Beginn der Autosporenfreisetzung nimmt die DCMU-Wirkung wieder zu und hat zur 22. Std, wenn alle Autosporen freigesetzt sind, wieder ihr Maximum erreicht. Autosporen reagieren auch schneller auf DCMU als Mutterzellen (Abb. 34).

Diese beiden Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die unterschiedliche Hemmung im Synchronzyklus Folge einer altersbe-

dingten Veränderung der Permeabilität der Zellmembran ist. Ein prinzipiell gleichartiges Ergebnis fanden bereits FRICKEL-FAULSTICH und SENGER (1972) im Synchronzyklus von Scenedesmus. Sie diskutieren eine Möglichkeit der Regulation der DCMU-Wirkung über den Redoxzustand des Quenchers Q, schließen jedoch auch eine mit dem Zellalter variierende Permeabilität nicht aus.
Da auch mit höheren DCMU-Konzentrationen die Photosynthese nicht immer total gehemmt werden konnte, erwies sich die Messung der Atmung im Licht unter den gegebenen Bedingungen als unsicher. Stattdessen wurde der im Anschluß an die O_2-Produktion im Licht bei Verdunklung gemessene Sauerstoffverbrauch als Dunkelatmung registriert.

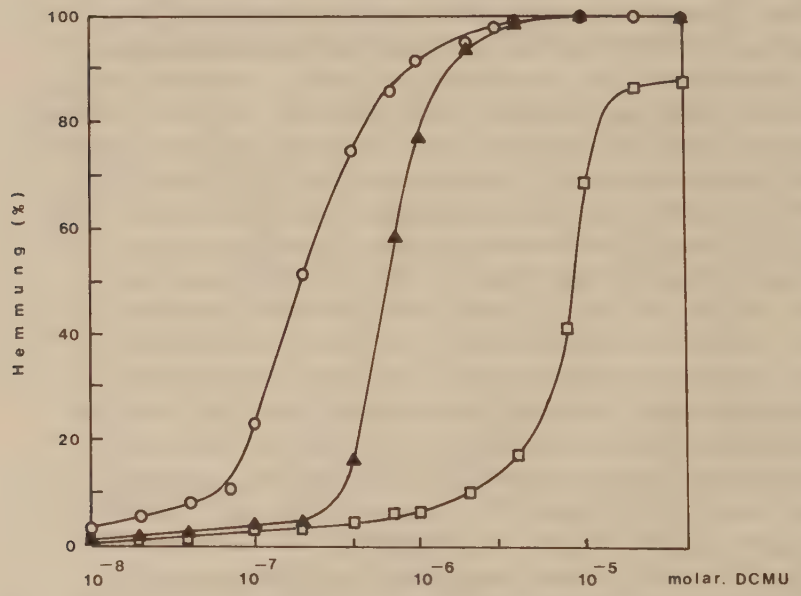

Abb. 32: Prozentuale Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration in drei verschiedenen Entwicklungsstadien einer Synchronkultur von Chlorella.
○—○ 3. Std
▲—▲ 9. Std
□—□ 17. Std

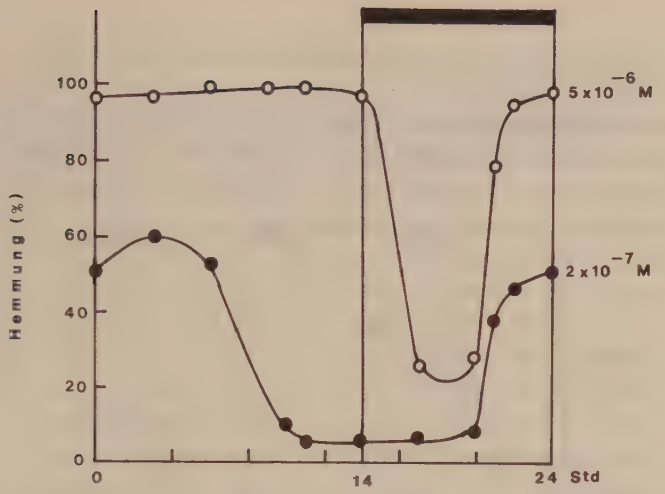

Abb. 33: Prozentuale Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion durch DCMU während des Synchronzyklus von Chlorella.

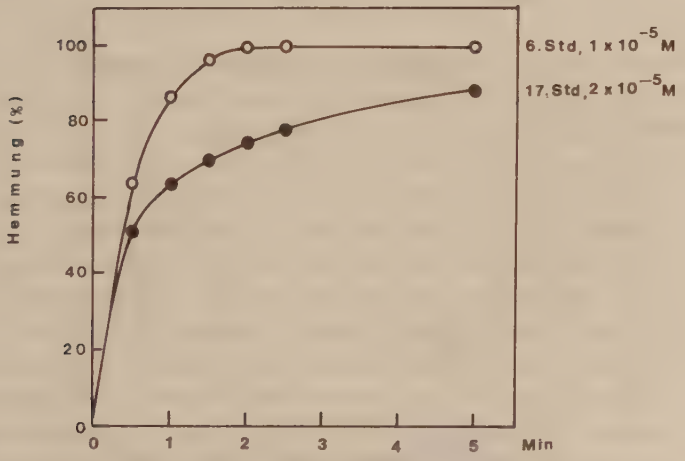

Abb. 34: Zeitlicher Verlauf der DCMU - Hemmung in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien einer Synchronkultur von Chlorella.

4.2 Photosynthese

Die photosynthetische Sauerstoffproduktion einer Chlorella-Kultur im Normalzyklus und bei Schockwirkung bzw. Regeneration ist in Abb. 35 (oben), auf Chlorophyll bezogen in Abb.

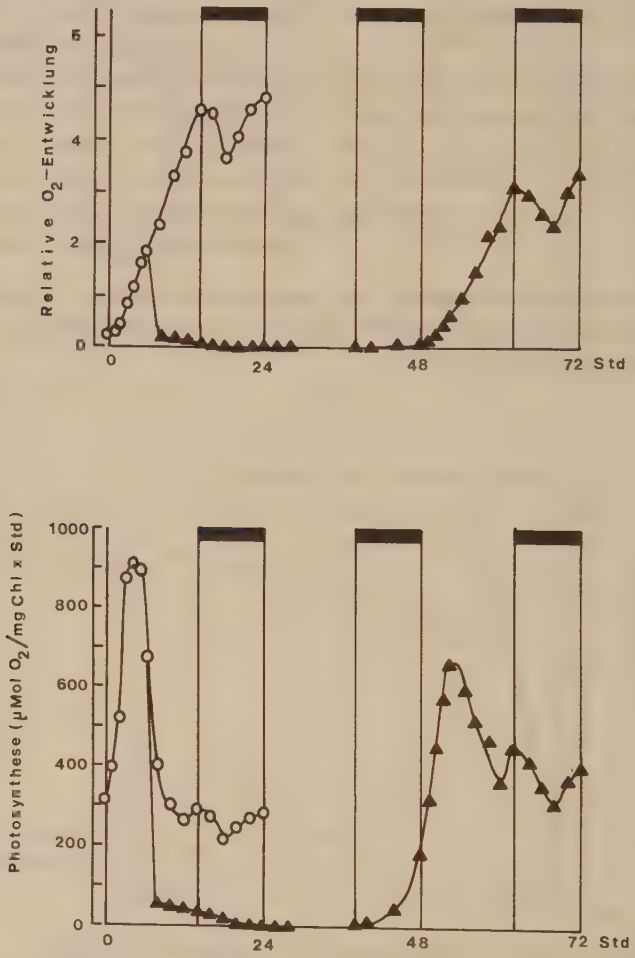

Abb. 35: Photosynthetische Sauerstoffproduktion (oben: relativ, unten: auf Chlorophyll bezogen) von Chlorella im Verlauf eines Synchronzyklus o——o und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C) bzw. in der Regeneration ▲——▲.

35 (unten, vgl. auch Abb. 19) wiedergegeben. Der Verlauf der Normalkultur stimmt mit Befunden aus älterer und jüngster Literatur überein. SOROKIN (1957) beschreibt bei einem Hochtemperaturstamm von Chlorella ein Maximum in der Sauerstoffproduktion, das in Lage und Höhe mit dem hier dargestellten gleich ist. Einen gleichartigen Verlauf mit einem Anstieg auf das Doppelte bis zu einem Maximum in der 8. Std finden METZNER und LORENZEN (1961) bei Chlorella in einem LDW 16:12 und FRICKEL-FAULSTICH und SENGER (1974) bei Scenedesmus und Chlamydomonas. Untersuchungen von SCHMID und GAFFRON (1968) und zuletzt von MYERS und GRAHAM (1975) bestätigen bei Scenedesmus die Lage des Maximums: In der 4. Std des Synchronzyklus ist die lichtgesättigte Sauerstoffproduktion pro Chlorophyll am höchsten. Im Zusammenhang mit der Chlorophyllentwicklung (vgl. Abb. 27 unten) läßt dieses Maximum vermuten, daß in den ersten vier Lichtstunden viele kleinere aber sehr aktive Photosynthese-Reaktionszentren gebildet werden, in welche später synthetisiertes Chlorophyll eingebaut wird, ohne daß dadurch zugleich die Photosyntheseleistung gesteigert würde (vgl. GRIMME and PORRA 1974).
Von allen bisher untersuchten Parametern reagiert die Sauerstoffproduktion am schnellsten und stärksten auf den Kälteschock (vgl. Abb. 13). Reduktion von Photosynthese und Atmung als Folge von Tieftemperaturbehandlung wurde auch bei Höheren Pflanzen gefunden. WRIGHT und SIMON (1973) beschrieben Erniedrigungen von Photosynthese und Atmung im Zusammenhang mit Chlorophyllverlust bei Kürbisblättern, die bei 5° C belichtet wurden. Diese Reaktion ist lichtabhängig und die Pflanzen können anschließend wieder regenerieren. TAYLOR und ROWLEY (1971) fanden einen unterschiedlichen Abfall der Photosyntheserate nach Kältebehandlung mit 10° C bei verschiedenen Höheren Pflanzen. Ein Ausbleichen der Pflanzen, das besonders hoch nach einem Kälteschock zu Beginn einer Photoperiode ist, trat niemals ein, bevor nicht die Photosyntheseaktivität bedeutend stärker geschädigt war.

Gegen Ende der 2. Dunkelzeit hat sich der Photosyntheseapparat soweit erholt (vgl. S. 70), daß ein deutlicher Anstieg

der Raten zu erkennen ist. Die Regeneration läuft im 3. Zyklus weiter, wenngleich die Maximalrate der Normalkultur in der 4. Std noch nicht erreicht wird. Im Vergleich mit der Regeneration von KH, Pr, TG und Gesamtchlorophyll (Abb. 26, 27) wird ersichtlich, daß eine teilweise Regeneration der photosynthetischen Aktivität Voraussetzungen für eine erneute positive Nettosynthese der Zellbestandteile ist.

4.3 Atmung

Der Verlauf der normalen Dunkelatmung ähnelt sowohl relativ (Abb. 36 oben) als auch auf Protein bezogen (Abb. 36 unten) dem der Photosynthese. Möglicherweise besteht eine Beziehung zwischen potentieller Sauerstoffproduktion im Licht und dem Sauerstoffverbrauch während direkt anschließender Verdunklung (vgl. auch ROSENSTOCK und RIED 1960). Auch bei der Dunkelatmung findet man ein Minimum zur Zeit der Autosporenfreisetzung und einen starken Anstieg im Verlauf der ersten Lichtstunden mit einem Maximum in der 4. Std (vgl. RIED et al. 1963). Ein zweites Maximum zu Beginn der Dunkelzeit, wie es von diesen Autoren oder auch von WOLF (1964) beschrieben wurde, tritt nicht auf. Vielleicht ergeben sich diese Unterschiede aus den verschiedenen Meßmethoden.
Als Schockfolge wird die Dunkelatmung wie schon die Photosynthese sehr schnell verringert; auf Protein bezogen geht sie allerdings nur um etwa die Hälfte zurück. Starke Atmungshemmung als Folge tiefer Temperatur wurde u.a. von Brassica-Keimlingen (BUSCHBECK 1967) verbunden mit gehemmter Chlorophyllbildung oder auch von Reisblättern (KISHITANI and TSUNODA 1974) beschrieben. Der schnelle Abfall von Photosynthese- und Atmungsaktivität bei zunächst konstantem Pigmentgehalt läßt den Schluß zu, daß die wesentlichen primären Schädigungen auf Inaktivierung von Enzymen oder Unterbrechung von Elektronentransportketten beruhen.
Bereits im zweiten Zyklus ist ein Wiederanstieg der Dunkelatmung zu verzeichnen. Im 3. Zyklus ist dann wieder ein deutliches, wenn auch zeitlich etwas verschobenes Maximum vor-

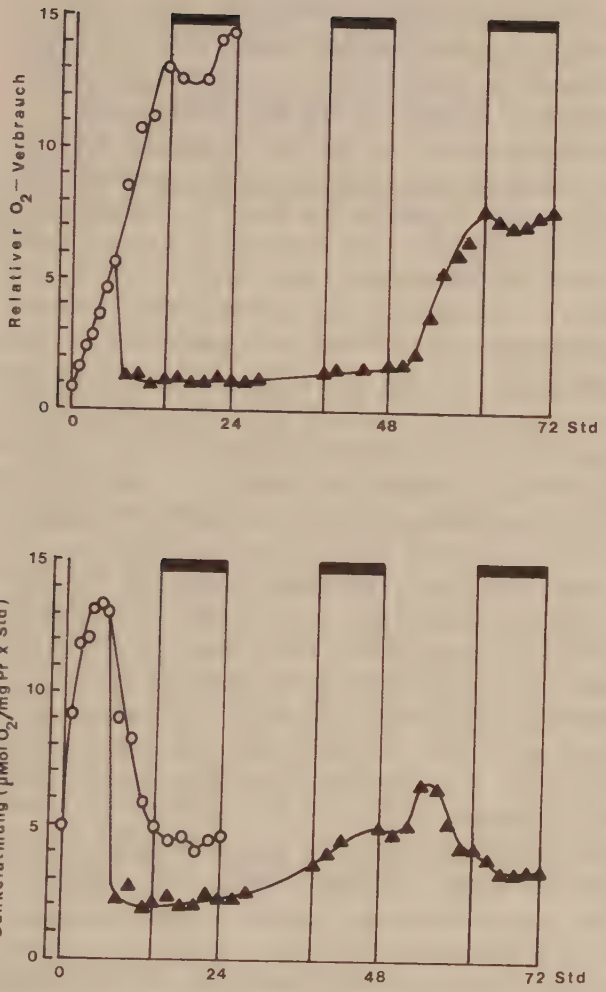

Abb. 36: Dunkelatmung (oben: relativ, unten: auf Protein bezogen) von Chlorella im Verlauf eines Synchronzyklus o——o und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C) bzw. in der Regeneration ▲——▲.

handen, doch ist die physiologische Koordinierung noch nicht optimal. Eine Regeneration der Atmung nach dem Kälteschock, wie sie auch von AMIN (1969) an Tabakpflanzen beobachtet wird, beginnt früher als die der Photosynthese. Dies ist nicht verwunderlich, da für den Neubeginn der Synthesen erst der Energiehaushalt regeneriert werden muß und dies wegen der fehlenden Pigmente nur über die Atmung erfolgen kann.

5. Absorptionsspektren

Durch geeignete Methoden können die Pigmente einzeln aufgetrennt und sowohl qualitativ wie auch quantitativ bestimmt werden (vgl. Kap. II, 3). Die Ergebnisse geben aber nicht die Verhältnisse in vivo wieder. So treten z.B. die Chlorophylle in verschiedenen Formen auf, die durch die Bindung mit Proteinen, Lipoproteinen, Lipiden und Carotinoiden zu Partikeln zustandekommen und eine Verschiebung der Absorptionsmaxima in den längerwelligen Spektralbereich bewirken (FRENCH 1971). Absorptionsspektren der ganzen Algen bei Raumtemperatur können in dieser Hinsicht bereits ein differenziertes Bild ergeben, allerdings ist wegen der Breite der Absorptionsbanden keine hohe Auflösung möglich. Eine schärfere Bande erzielt man in Tieftemperatur-Absorptionsspektren (z.B. in flüssigem Stickstoff).
Mit Hilfe der Derivativspektroskopie konnte eine erste Analyse der Tieftemperaturspektren erfolgen (FRENCH 1957, MEISTER 1966). Erste und zweite Ableitung dieser Absorptionskurven geben Hinweise über die genaue Lage der Maxima verschiedener Einzelkomponenten, die ihrerseits summarisch die vorhandenen Spektren bilden.
Auf der Grundlage eines "Konzepts der konstanten Komponenten" konnte FRENCH die meisten seiner Spektren aus den verschiedensten Pflanzen durch Kombination von 4 Hauptkomponenten des Chl a und im Einzelfall von zusätzlich 2 Extra-Komponenten im langwelligen Licht gut nachvollziehen. Die Unterschiede in den Spektren entstehen durch die verschiedenen Anteile der einzelnen Komponenten. Mit dieser Technik fand FRENCH folgende Chlorophyllformen (FRENCH et al. 1971 a, 1971 b):

Chl b 640 nm (sehr geringer Anteil des Chl b)
Chl b 650 nm (Hauptteil des Chl b)
Chl a 662 nm
Chl a 670 nm } Hauptkomponenten des Chl a
Chl a 683 nm
Chl a 693 nm
Chl a 705 nm } Extra-Komponenten des Chl a

Durch Vergleich von Fraktionen mit unterschiedlichen PS I, PS II-Aktivitäten (MICHEL and MICHEL-WOLWERTZ 1969) mit ihren Tieftemperaturspektren war es möglich, die verschiedenen Chlorophyllformen den Photosystemen zuzuordnen; danach gehören Chl a 683, Chl a 692 und Chl a 705 zum PS I, Chl a 670 und Chl a 677 zum PS II.
MACHOLD et al.(1971) fanden übereinstimmend mit Hilfe von Derivativspektren von elektrophoretisch getrennten Pigment-Protein-Komplexen aus Chlorella drei Zonen, von denen die erste (PS I) langwelliges Chl a und kein Chl b enthielt, die zweite (PS II) kurzwelliges Chl a und Chl b und die dritte freies Chl a und Chl b. Diese Zuordnung wird ebenfalls durch die Ergebnisse der Untersuchungen von WIESSNER und FRENCH (1970) an Chlamydobotrys gestützt: Beim Übergang von heterotropher zu autotropher Ernährung erfolgt Umwandlung von längerwelligem Chl a in kürzerwelliges Chl a, das in PS II dominiert. Die Absorptionsbanden der Chlorophylle im Blaubereich des Spektrums werden von den Carotinen und Xanthophyllen überlagert, so daß eine Identifizierung hier schwieriger wird (vgl. MICHEL-WOLWERTZ and MICHEL 1969).

5.1 Absorption der Gesamtpigmente

Die Spektren der methanolischen Pigmentextrakte aus unterschiedlich behandelten Algen sind z.B. in Abb. 6, 11, 17 wiedergegeben. Genauere qualitative Aussagen können damit nicht gemacht werden. Jedoch ist die bei Kälteschock auftretende Verschiebung der Maxima im blauen Spektralbereich ein eindeutiges Phänomen, das bereits an anderer Stelle diskutiert wurde (s.S.69). Quantitative Veränderungen der Pigmentgarnitur einer normalen Synchronkultur in Abhängig-

keit vom Zellalter (vgl. Kap. II, 3) sind im Gesamtpigmentspektrum nur im geringen Maße festzustellen (Abb. 37). Ähnlich geringe entwicklungsabhängige Veränderungen wurden bereits von SENGER und BISHOP (1971) für Scenedesmus beschrieben.

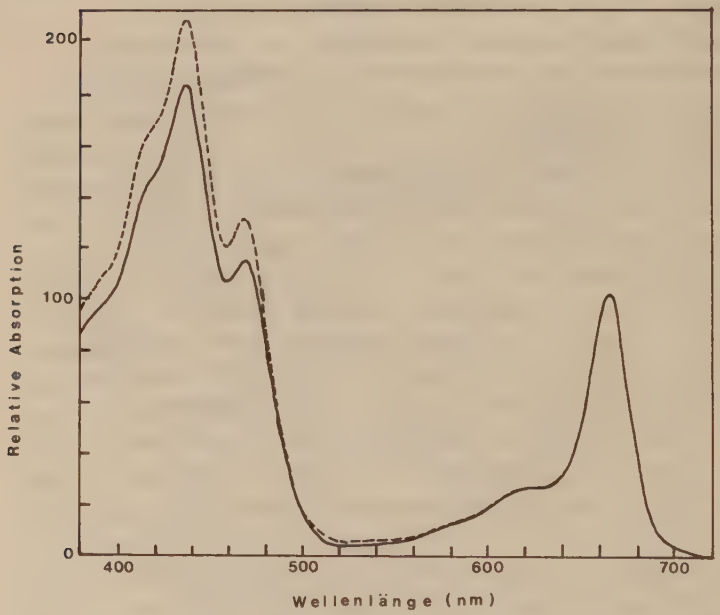

Abb. 37: Absorptionsspektren von Pigmentextrakten aus synchronen Chlorellen.
—— 0. = 24. Std
---- 8. Std
Die Kurven wurden normalisiert: $A_{665} = 100$, $A_{720} = 0$.

5.2 Absorption der Zellen in vivo

Neben den Pigmentspektren können die "in vivo"-Spektren ganzer Zellen eine Aussage über Veränderungen im Verlauf des Synchronzyklus und als Folge des Kälteschocks machen. Abb. 38 läßt keine deutlichen Unterschiede zwischen zwei Entwicklungsstadien erkennen, was wiederum den Befunden von SENGER und BISHOP (1971) entspricht. Aus Abb. 39 ist die Veränderung des Absorptionsspektrums ganzer Zellen im Verlauf des Ausbleichens und während der Regeneration zu ersehen. Während des Ausbleichens verringert sich das Rotmaximum und verschiebt sich leicht in den kürzerwelligen Bereich. Damit geht auch die Differenzierung der Schulter (670 nm) und des Maximums (680 nm) verloren. Im Verlauf der

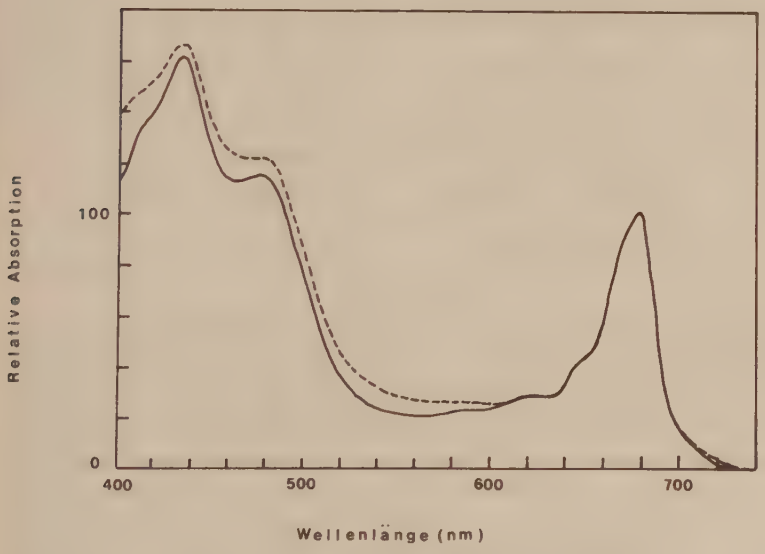

Abb. 38: Absorptionsspektren bei Zimmertemperatur von synchronen Chlorella-Zellen.
—— 0. = 24. Std
---- 8. Std
Die Kurven wurden normalisiert: $A_{680} = 100$, $A_{720} = 0$.

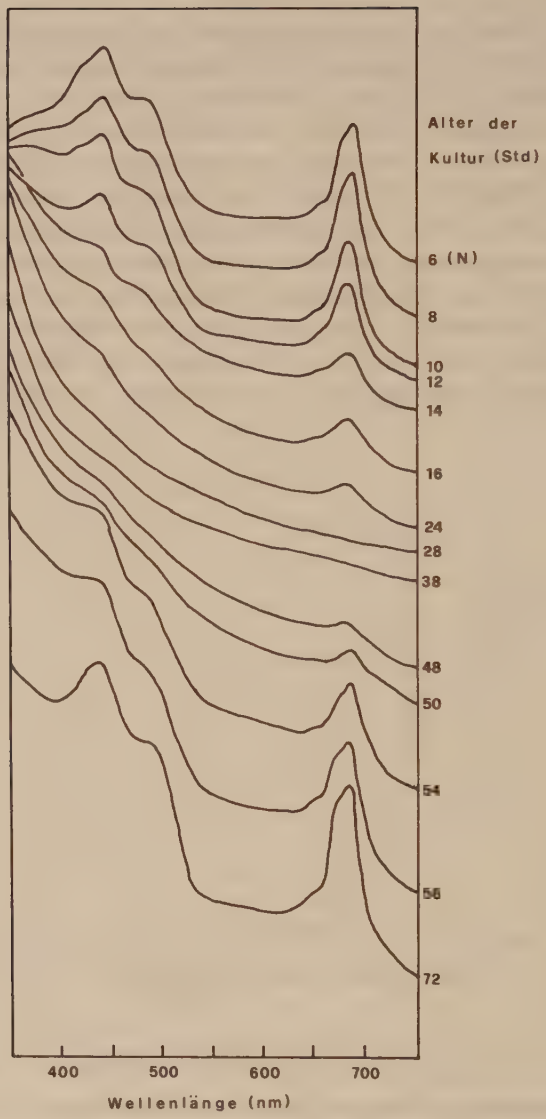

Abb. 39: Absorptionsspektren bei Zimmertemperatur von Chlorella-Zellen im Verlauf des Ausbleichens und der Regeneration.

Regeneration tritt diese Differenzierung erstmals nach 54 Std (6. Std des 3. Zyklus) wieder auf. Das gibt einen Hinweis auf unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Chlorophyllformen. Der Blaubereich zeigt mit zunehmender Schockwirkung eine relative Absorptionserhöhung gegenüber dem Rotbereich, womit zugleich die Differenzierung in Maxima und Schultern verlorengeht. Zu gleichen Ergebnissen kamen MARVIN III und KARLANDER (1974), die das Ausbleichen von Chlorella bei 10° C im Licht über 22 Std untersuchten. Die hohe Absorption im blauen Spektralbereich wird von ihnen durch intrazelluläre Streuung und Abbauprodukte der Pigmente erklärt.

5.3 Absorptionsspektren bei Tieftemperatur

Tab. 19

Maxima und Schultern im Tieftemperatur-Absorptionsspektrum von Chlorella

420 nm	Schulter	625 nm	Maximum
440 nm	Maximum	650 nm	Maximum
478 nm	Maximum	670 nm	Schulter
498 nm	Schulter	678 nm	Maximum

Wesentlich schärfere Spektren sind bei tieferen Temperaturen (77° K) zu erreichen. Unter den gegebenen Bedingungen ist jedoch keine quantitative Auswertung möglich. Eine Normalisierung auf das Absorptionsmaximum bei 678 nm und die Festlegung einer Null-Linie bei 720 nm ermöglicht einen qualitativen Vergleich. Maxima und Schultern, die im Spektrum der Normalkultur von Chlorella gefunden wurden, sind in Tab. 19 wiedergegeben. Unsere Werte stimmen mit den bisher bekannten Banden (MICHEL-WOLWERTZ and MICHEL 1969, CHO and GOVINDJEE 1970, FRENCH 1970) gut überein. Veränderungen im Spektrum der Normalkultur im Verlaufe des Synchronzyklus treten nur im geringen Maße im Blaubereich auf (vgl. SENGER and BISHOP 1971) und können ihre Ursache sowohl in der Zusammensetzung der Pigmente als auch in der Zellstruktur

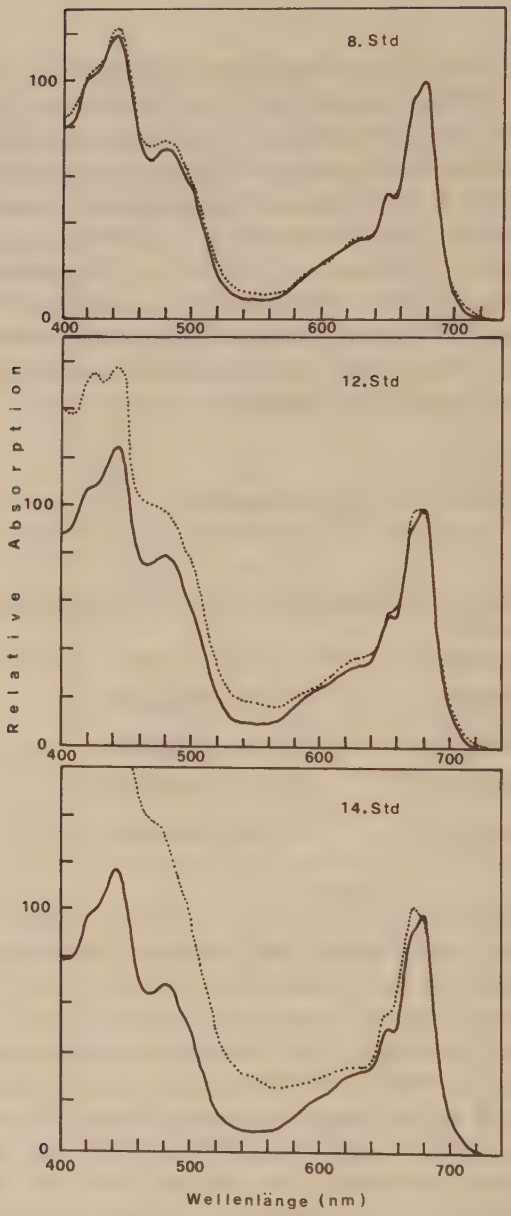

Abb. 40: Absorptionsspektren bei 77°K von Chlorella im Verlauf des Synchronzyklus —— und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C) ·····.
Die Kurven wurden normalisiert: $A_{678} = 100$, $A_{720} = 0$.

haben. Wesentliche Unterschiede weisen die Spektren der kältegeschockten Algen auf (Abb. 40). Unter Normalbedingungen findet man im Tieftemperaturabsorptionsspektrum von Chlorella im Rotbereich ein Maximum bei 678 nm (FRENCH 1970) und eine Schulter bei 670 nm (BROWN 1969). Infolge des Kälteschocks wird diese Differenzierung (Abb. 40, 8. Std) zunächst ausgeglichen - in der 12. Std (4. Std nach dem Schock) erscheint ein breites Maximum im Bereich 670 - 680 nm (Abb. 40, 12. Std) - und im weiteren Verlauf umgekehrt - nach 14 Std hat sich bei 670 nm ein Maximum und bei 678 nm eine Schulter gebildet. Zu diesem Zeitpunkt ist in der Regel nur noch 65 % des Chlorophylls aus der 6. Std (vor dem Schock) vorhanden. Bis zur 24. Std, in der nur noch etwa 5 % des Chlorophylls verblieben ist, ändern sich diese Relationen nur noch geringfügig.
Derartige Verschiebungen im Spektrum könnten die Folge von Umwandlungen des im längerwelligen Spektralbereich absorbierenden Chl a in solches sein, das im kürzerwelligen Bereich absorbiert, wie sie nach Erhitzen (MEISTER und MASLOVA 1969) oder nach kurzfristiger Behandlung mit Proteasen (MICHEL-WOLWERTZ 1969) erfolgen. In diesen Fällen blieb der Gesamtchlorophyllgehalt allerdings konstant. Im Falle des Kälteschocks muß also eine andere Ursache vorhanden sein, nämlich eine unterschiedliche Empfindlichkeit: Chl a 678 wird früher und schneller geschädigt als Chl a 670. Im Gesamtspektrum tritt Chl a 678 nur noch als Schulter auf, während das nun dominierende Chl a 670 zum Maximum wird. Eine ähnliche unterschiedliche Schädigung (Zunahme des Verhältnisses Chl a 670 / Chl a 678) konnte MICHEL-WOLWERTZ erreichen, wenn sie die Proteasenbehandlung verlängerte. THOMAS und NIJHUIS (1968) beobachteten an isolierten Chloroplasten von Aspidistra elatior im Starklicht primär ein Ausbleichen von Chl a 680, sekundär auch von Chl a 670. Parallel zu dieser Erscheinung wird das Chl b-Maximum bei 650 nm infolge Kälteschocks zu einer Schulter reduziert. Dies deutet auf eine größere Empfindlichkeit des Chl b hin, was jedoch nach den Ergebnissen der Pigmentanalysen mittels Dünnschichtchromatographie kaum in Frage kommt (vgl. Kap. II, 3). Die Ursache liegt wahrscheinlich überwiegend in

der relativen Zunahme der kurzwelligen Chl a-Bande, die eine stärkere Überlappung mit Chl b 650 bedingt (vgl. MEISTER und MASLOVA 1969).
Da man sowohl das kurzwellige Chl a als auch Chl b im wesentlichen dem PS II zuordnet, kann man aus diesen Veränderungen ableiten, daß PS II besonders stark durch die Kälte geschädigt wird. Das längerwellige Chl a (Chl a 696, Chl a 705) ist im Spektrum nicht eindeutig zu erfassen, so daß in diesem Zusammenhang keine weitere Aussage zu PS I gemacht werden kann. Interessant ist, daß TISCHNER (1974) die gleiche Verschiebung bei synchroner Chlorella nach kurzzeitiger Erhitzung im Dunkel auf 45° C erhielt. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse von MICHEL-WOLWERTZ (1969) weist darauf hin, daß das proteingebundene Chl a besonders stark empfindlich gegen die tiefe Temperatur ist.
Die Verschiebung von Maximum bei 440 nm und Schulter bei 410 nm zugunsten der kürzerwelligen Komponente, die bereits in Kap. II, 3 diskutiert wurde, wird durch die Tieftemperatur-Absorptionsspektren bestätigt. Die gleichzeitige Reduktion des Maximums bei 486 nm zur Schulter wird durch den starken Carotinverlust verursacht (vgl. S.67). Allerdings wird das Gesamtspektrum mit zunehmender Schockwirkung immer mehr durch Abbauprodukte der Pigmente (vgl. FRENCH 1971) und anderer Zellbestandteile, z.B. Fettsäuren (vgl. Kap. II, 2) beeinflußt. Dieser Effekt nimmt so stark zu, daß die Absorption im Blaubereich bei Normalisierung auf die Absorption bei 678 nm unmeßbar groß wird (Abb. 40, 14. Std).
Im Laufe der Regeneration (Abb. 41) normalisiert sich zuerst das Verhältnis Chl a 670 / Chl a 678. Nach 54 Std (6. Std des 3. Zyklus) sind Schulter und Maximum wieder im Normalverhältnis, während Chl b immer noch nur als Schulter auftritt und die Absorption im Blaubereich noch unverändert ist.
In diesem Zusammenhang können auch unsere Spektren nach abgewandelter Schockbehandlung interpretiert werden (Abb. 42). Eine Behandlung mit Kälte und Dunkel in der empfindlichen Zeit beeinträchtigt die Algen in ihrer spektralen Zusammensetzung nicht. Die Behandlung mit Kälte, Licht und Stickstoff verursacht im Absorptionsspektrum eine Verschiebung

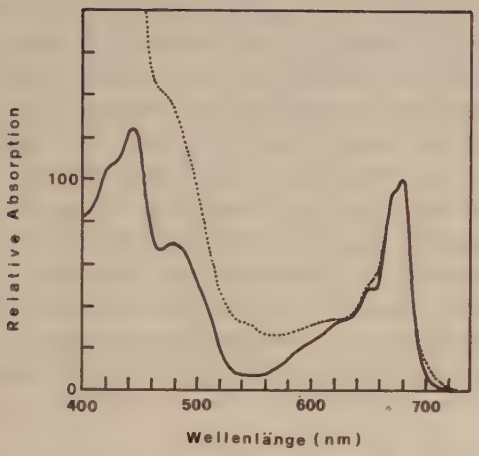

Abb. 41: Absorptionsspektren bei 77°K von Chlorella im Verlauf des Synchronzyklus (6.Std) —— und während der Regeneration nach Kälteschock (54.Std) ·····. Die Kurven wurden normalisiert: $A_{678} = 100$, $A_{720} = 0$.

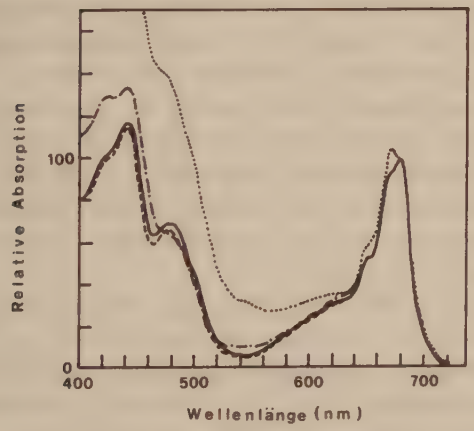

Abb. 42: Absorptionsspektren bei 77°K von Chlorellakulturen (24.Std) nach verschiedener Behandlung.

—— Normal

····· 2 Std 4,5°C,Licht

-·-·- 2 Std 4,5°C,Licht,Stickstoffbegasung

---- 2 Std 4,5°C,Dunkel

Die Kurven wurden normalisiert: $A_{678} = 100$, $A_{720} = 0$.

im blauen Spektralbereich: Das Maximum bei 486 nm wird verringert, die Absorption im kurzwelligeren Bereich relativ erhöht und das Verhältnis der Banden 417 nm / 438 nm leicht verschoben. Dies bestätigt die bisherigen Ergebnisse: Die Kältewirkung tritt nicht im Dunkel ein (vgl. Abb. 14) und kann im Licht durch Stickstoffbegasung verringert werden (vgl. Tab. 8). Versteht man also die Behandlung mit Kälte, Licht und Stickstoffbegasung als einen Standardschock mit stark abgeschwächter Wirkung, so bestätigt das Spektrum mit seinen normalen Verhältnissen im roten Spektralbereich und den Veränderungen im blauen, insbesondere bei 486 nm, daß die Schädigung durch den Kälteschock beim Carotin ansetzt (vgl. Abb. 30).

6. Fluoreszenz-Spektren

6.1 Fluoreszenz-Anregungsspektren bei Raumtemperatur

Für kinetische Untersuchungen dient häufig die Messung der relativen Fluoreszenzausbeute ("relative fluorescence yield"). Für die Beschreibung eines Systems, das während der Messung konstant bleibt, eignen sich besonders Fluoreszenzspektren und Fluoreszenz-Anregungsspektren (GOEDHEER 1972, PAPAGEORGIOU 1975). Die Fluoreszenz von Chlorella im Synchronzyklus wurde erstmals von DÖHLER (1962) gemessen. Er fand größere Veränderungen in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Algen. Für Scenedesmus und Chlamydomonas (SENGER and BISHOP 1971, FRICKEL-FAULSTICH und SENGER 1974) liegen inzwischen ähnliche Resultate vor.
Es wird angenommen, daß bei Raumtemperatur die Fluoreszenz fast ausschließlich vom PS II und zwar nur von Chl a, am meisten von Chl a 678 stammt. Die Hauptbande der Fluoreszenz liegt bei 688 nm (PAPAGEORGIOU 1975), die Rate ist von verschiedenen Faktoren abhängig, u.a. vom Redoxzustand der "traps" des Photosystems (WIESSNER and FRENCH 1970). Bei tiefen Temperaturen kommt noch eine Fluoreszenz vom Chl a des PS I mit Hauptbanden im Bereich 720 - 740 nm hinzu (GOEDHEER 1972). Chl b fluoresziert nicht, trotzdem ist es an der

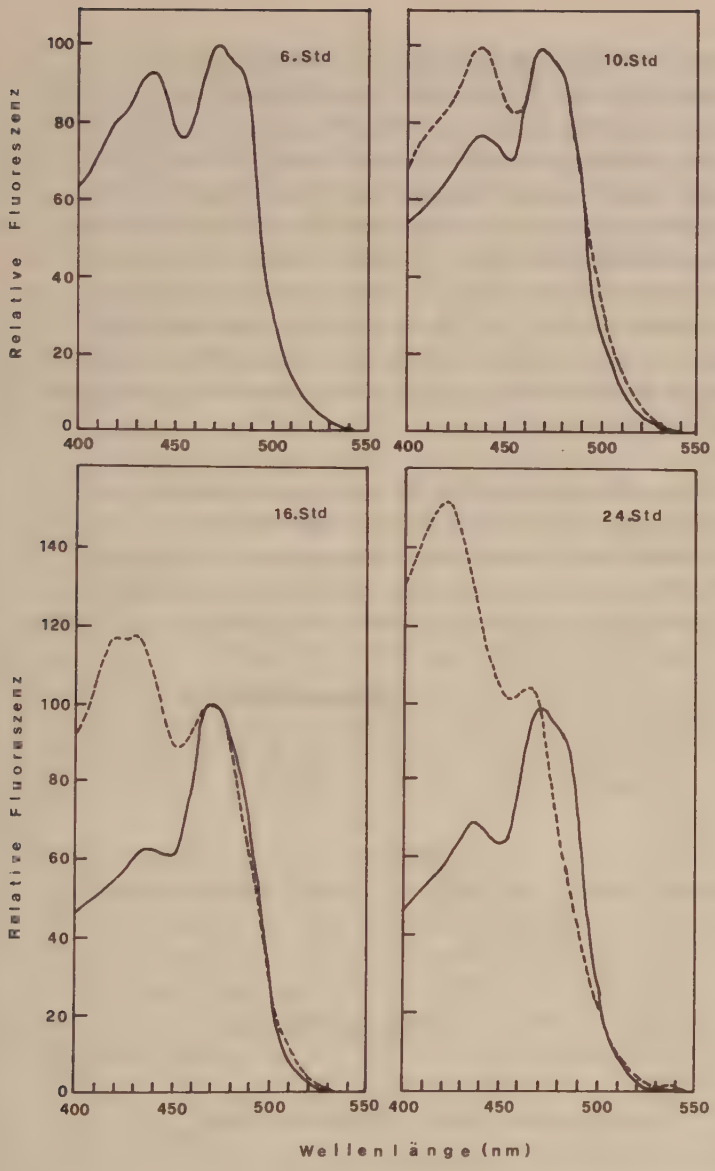

Abb. 43: Fluoreszenz-Anregungsspektren im blauen Spektralbereich von Chlorella im Verlauf des Synchronzyklus —— und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C) ----. Messungen bei Raumtemperatur, Emission bei 684 nm. Die Kurven wurden normalisiert: $F_{470 \rightarrow 684} = 100$, $F_{550 \rightarrow 684} = 0$.

Fluoreszenz beteiligt. Mit Hilfe von Differenzspektren (YENTSCH and GUILLARD 1969) und durch Vergleich von Aktions- und Absorptionsspektren wurde nachgewiesen, daß sowohl die vom Chl b als auch die von den Carotinoiden absorbierte Lichtenergie zumindest teilweise zum Chl a transferiert wird (GOEDHEER 1972). Die Übertragung erfolgt temperaturunabhängig von Chl b zu 100 % (FRENCH 1960), von den Carotinen nur zu Hälfte (FRENCH 1960 , CHO and GOVINDJEE 1970 b), von den Xanthophyllen in noch geringerem Maße. Der optimale Energietransfer hängt vom Abstand der Moleküle sowie von der Ähnlichkeit der Emissions- bzw. Absorptionsbanden ab (GOEDHEER 1972).
In Abb. 43 ist eine Auswahl von Fluoreszenz-Anregungsspektren von Chlorella-Kulturen zu verschiedenen Zeiten des Synchronzyklus und nach Kälteschock wiedergegeben. Im Verlaufe des Zyklus der Normalkultur verändert sich das Verhältnis der Maxima bei 435 und 470 nm. Dieses Verhältnis (Abb. 44) steigt bis zu einem Maximum zwischen 4. und 6. Std,

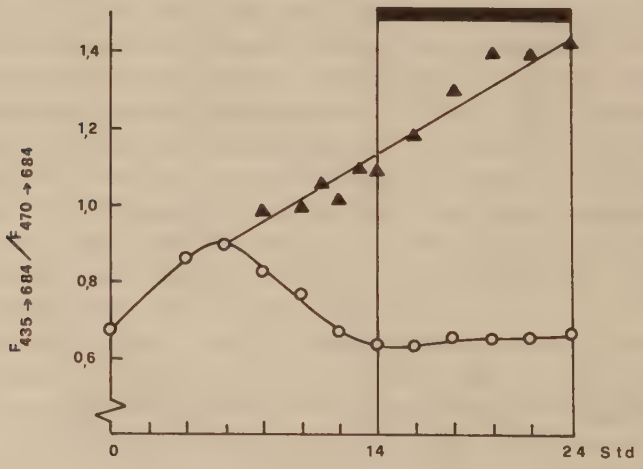

Abb. 44: Quotient der Fluoreszenzsignale, angeregt bei 435 nm und 470 nm im Verlauf des Synchronzyklus von Chlorella o——o und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C) ▲——▲.

danach beobachtet man einen Abfall bis zum Ende der Lichtzeit und nur eine geringfügige Veränderung in der Dunkelzeit. Die Kurve hat eine auffallende Ähnlichkeit mit dem Verhältnis Chl a / Chl b im Synchronzyklus, das mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie bestimmt wurde (Abb. 29). Auch die photosynthetische Sauerstoffentwicklung (Abb. 19, 35) hat ein Maximum in der 4. Std. Wegen der Ähnlichkeit im Verhältnis der Pigmente Chl a / Chl b und der Fluoreszenzemissionsraten $F_{435 \rightarrow 684}$ / $F_{470 \rightarrow 684}$ im Verlauf des Synchronzyklus läßt sich schließen, daß Chl b bei Chlorella hauptsächlich als akzessorisches Pigment für PS II dient (vgl. YENTSCH and GUILLARD 1969, GOEDHEER 1972, PAPAGEORGIOU 1975).

Da sich nach Untersuchungen von SCHMID und GAFFRON (1968) und neuerlich von MYERS und GRAHAM (1975) die Photosyntheseeinheit im Verlauf eines Synchronzyklus nur unbedeutend verändert, muß hier die Möglichkeit einbezogen werden, daß Veränderungen in den Poolgrößen von Intermediaten zwischen den Photosystemen (FRICKEL-FAULSTICH und SENGER 1974) und Änderungen von Enzymaktivitäten im Calvinzyklus (MYERS and GRAHAM 1975) an der Regulierung beteiligt sind, wobei dem Stoffwechselmechanismus eine größere Kontrollfunktion als dem Photosyntheseapparat selbst zuerkannt wird (MYERS and GRAHAM 1975).

In kältegeschockten Algen findet man stark veränderte Fluoreszenz-Anregungsspektren (Abb. 43). Nach dem Schock verschiebt sich die Höhe der Peaks stark zugunsten des von Chl a (435 nm). Die Verlaufskurve, die das Verhältnis der Fluoreszenzsignale F_{684} angeregt bei 435 nm und 470 nm wiedergibt, steigt nach dem Schock linear während der noch verbleibenden 6 Licht- und 10 Dunkelstunden von 0,9 auf 1,4 an, während sie bei einer Normalkultur nach dem Maximum wieder auf etwa 0,6 abfällt (Abb. 44). CHO und GOVINDJEE (1970 b) fanden bei Tieftemperatur-Fluoreszenz-Anregungsspektren von Chlorella pyrenoidosa ein Verhältnis von 1,0.

Für die Deutung bieten sich zunächst zwei Möglichkeiten an: Durch den Kälteschock wird Chl b bedeutend stärker geschädigt als Chl a; Chl b kann deshalb weniger absorbieren und leitet demnach auch weniger an das bei 684 nm fluoreszierende Chl a

weiter. Diese Möglichkeit steht allerdings im Widerspruch zu unseren Ergebnissen aus der Pigmentchromatographie (vgl. S.67), wonach in Geschwindigkeit und Stärke der Schädigung als Folge des Kälteschocks bei Chl a und Chl b keine bedeutende Unterschiede auftreten. Der Anteil der Carotinoide an dieser Veränderung kann nicht sehr groß sein, da ihr Übertragungspotential sehr gering ist. Für eine so starke Veränderung im Verhältnis $F_{435 \rightarrow 684} / F_{470 \rightarrow 684}$ könnte z.B. eine Hemmung des Energietransfer zwischen Chl b und Chl a verantwortlich sein.
Der Kälteschock verringert also nicht nur den Pigmentgehalt, er verändert auch die Lage der Pigmentmoleküle zueinander so drastisch, daß damit auch der Energietransfer von den akzessorischen Pigmenten in die "traps" weitgehend unterbunden ist. Die Ergebnisse aus den Lipiduntersuchungen (Kap. II, 2), die auf bemerkenswerte Veränderungen in den Membranstrukturen hinweisen, finden hier eine Bestätigung.

Die veränderte räumliche Lage innerhalb der Pigmentkomplexe bedingt aber nicht nur einen verringerten Energietransfer von den akzessorischen zu den photosynthetisch aktiven Pigmenten, sondern darüber hinaus können auch Chlorophyllmoleküle überschüssige absorbierte Energie nicht mehr an andere Moleküle ableiten, wodurch ihre photooxidative Zerstörung beschleunigt wird.

6.2 Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektren (77° K)

Fluoreszenz-Emissionsspektren von Chloroplasten oder Einzellern erlauben es, eine Beziehung der Photosysteme aufzustellen. Unter den beschriebenen Tieftemperaturbedingungen kann man die Emission im Maximum bei 722 nm (F_{722}) dem Pigmentsystem des PS I zuschreiben (BROWN and PRAGER 1969), während F_{690} von PS II stammt (GOVINDJEE 1972). Sowohl die Geschwindigkeit des Einfrierens bzw. die Gefriertemperatur selbst und damit die Struktur des Eises (CHO and GOVINDJEE 1970 a) wie auch die Salzkonzentration des Mediums (LI 1974) können das Verhältnis F_{722} / F_{690} stark beeinflussen. Veränderungen der Schichtdicke (und damit der Einfrierzeit) führen

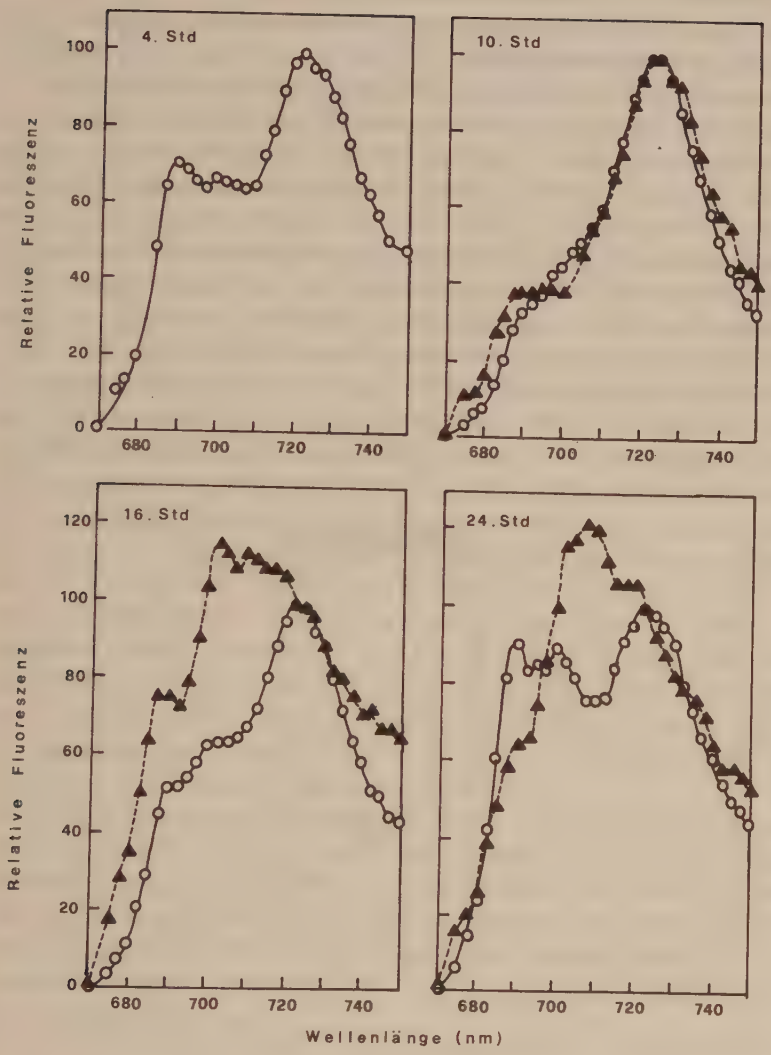

Abb. 45: Fluoreszenz-Emissionsspektren bei 77°K von Chlorellazellen im Verlauf des Synchronzyklus und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C). Anregung bei 642 nm.

o——o Normal

▲——▲ Kälteschock

Die Kurven wurden normalisiert: $F_{722} = 100$, $F_{670} = 0$.

zu Verschiebungen von Maximum und Minimum der Kurve PS I / PS II im Synchronzyklus, so daß ganz besonders auf konstante Bedingungen geachtet werden muß.
Fluoreszenz-Emissionsspektren bei 77° K von Chlorella in verschiedenen Stadien der Synchronentwicklung und nach dem Kälteschock sind in Abb. 45 wiedergegeben. Das Spektrum der 4. Std wie auch der 24. Std weist deutlich drei Emissionsmaxima bei 690 nm (F_{690}), 700 nm (F_{700}) und 722 (F_{722}) auf und entspricht somit den bekannten Fluoreszenz-Emissionsspektren (CHO and GOVINDJEE 1970 a, 1970 b), in denen F_{687} dem Chlorophyll a 678, F_{698} der "Trap" von PS II und F_{725} dem Chlorophyll a 685-715 zugerechnet wird. Im Verlaufe des normalen Synchronzyklus verringert sich das Signal bei 690 nm zunächst so stark, daß das Verhältnis F_{722} / F_{690} d.h. PS I / PS II-Fluoreszenz von 1,1 bis zu einem Maximum um die 10.- 12. Std von 3,2 ansteigt (Abb. 46). In der folgenden Zeit nimmt

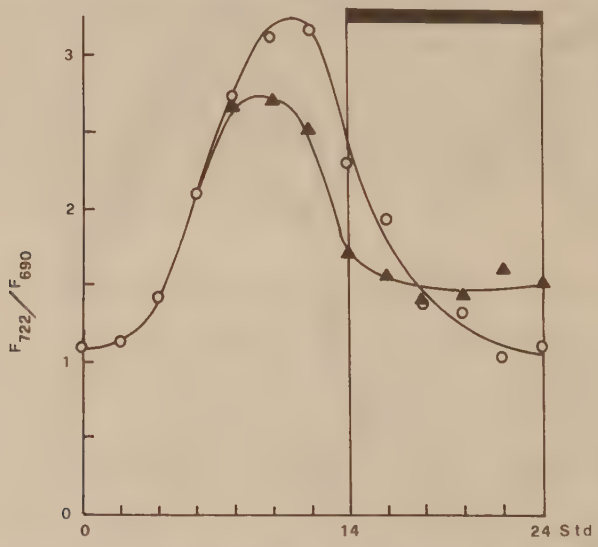

Abb. 46: Quotient der Fluoreszenzsignale bei 722 nm und 690 nm von Chlorellazellen im Verlauf des Synchronzyklus und nach Kälteschock. Anregung bei 642 nm.
o——o Normal
▲——▲ Kälteschock

das Signal bei 690 nm wieder stärker zu und das Verhältnis F_{722} / F_{690} sinkt auf den Ausgangswert ab. Aus diesem Ergebnis läßt sich ableiten, daß PS I im Synchronzyklus zur 10. - 12. Std seine höchste Aktivität hat. Entsprechende Fluoreszenzversuche von SENGER und BISHOP (1971) für den Synchronzyklus von Scenedesmus zeigen einen gleichartigen Verlauf mit einem schwachen Maximum in der 10. Std und einem starken Minimum in der 16. Std.
Betrachtet man das Verhältnis F_{722} / F_{690} der kältegeschockten Zellen, so stellt man überraschend fest, daß sich gegenüber der Normalkultur kein größerer Unterschied herausbildet (Abb. 46). Der wesentliche Unterschied der Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektren von kältegeschockten Algen und Normalalgen liegt in einer starken Verschiebung des Hauptmaximums in den Bereich F_{705} (Abb. 45). Eine eindeutige Erklärung kann dafür nicht gegeben werden. Mehrere Autoren gehen aufgrund gleichartiger Ergebnisse von der Annahme aus, daß F_{698} von einem Chlorophyll stammt, daß der Energie-Trap des PS II angehört (DONZE and DUYSENS 1969, DÖRING et al. 1968, MURATA 1968). Aus dem gleichartigen Verhalten bei veränderten Temperaturen von F_{698} und F_{687} postulieren CHO und GOVINDJEE (1970 b), daß die dafür verantwortlichen Pigmente vom gleichen Pigmentsystem stammen müssen. F_{698} stellt danach die Emission der Energie-Trap von PS II (P 680-690) dar, d.h. in ihr sind PS II-Partikel angereichert.
Unter diesen Voraussetzungen und unter Einbeziehung der gewonnenen Tieftemperaturabsorptions- sowie Fluoreszenz-Anregungsspektren können die Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektren kältegeschockter Algen als Bestätigung unterschiedlicher Schädigungen der Chl a-Formen sowie von Veränderungen im Energietransfer innerhalb der Photosysteme und zwischen beiden angesehen werden.

7. PS I - PS II Aktivitäten von Partikeln

Untersuchungen von Photosynthese-Teilreaktionen stoßen bei Chlorella auf Schwierigkeiten durch die begrenzte Permeabilität der Zellmembran. Messungen des PS II an intakten Chlorellazellen konnten bisher nur durch Hillreaktion mit Benzochinon (WARBURG und LÜTTGENS 1946, GIMMLER and AVRON 1971) durchgeführt werden, während die PS I Aktivität als CO_2-Fixierung mit H_2 adaptierten Algen (SENGER and BISHOP 1969) bestimmt wurde. Um die Schwierigkeiten, die mit intakten Algen auftreten, zu umgehen, wurden Chloroplastenpartikel verwendet (u.a. KOK and DATKO 1965, BERZBORN und BISHOP 1972, GRIMME and BOARDMAN 1972, MELL 1974). Eine andere Methode ist die Behandlung ganzer Algen mit Giften, die die Permeabilität der Zellen erhöhen sollen (LUNDLOW and PARK 1969).

Stets muß jedoch berücksichtigt werden, daß "in vitro"-Methoden zur Artefaktbildung führen können, so daß die Ergebnisse nicht unbedingt die "in vivo" Reaktionen widerspiegeln. GIMMLER und AVRON (1971) nehmen an, daß hinzugefügtes Benzochinon nicht nur mit den Strukturproteinen der Zellmembran reagiert, sondern auch Enzyme inaktiviert, während GRAHAM und SMILIE (1971) diskutieren, ob beim Aufbrechen der Algen eine mechanische Schädigung der Chloroplasten nicht notwendigerweise zu ihrer teilweisen Inaktivierung führt. GRIMME und BOARDMAN (1972) sowie JACOBI (1974) bezeichnen die Methoden, die bei der starken Zellwand von Chlorella zur Zellfraktionierung notwendig sind als so "drastisch", daß man nur Fragmente begrenzter funktioneller Kapazität erhält.Die Aktivität der Photosysteme wurde in unserem Falle von Partikeln gemessen, die durch Präparation nach BERZBORN und BISHOP (1972) gewonnen wurden.

Die Aktivitäten der Photosysteme I und II von normalen Chlorellazellen im Synchronzyklus und nach dem Kälteschock sind in Abb. 47 dargestellt. Es fällt sofort der parallele Verlauf beider Photosysteme der Normalkultur ins Auge. Die Kurven steigen am Beginn des Zyklus bis zu einem ersten Maximum zwischen der 4. und 6. Lichtstunde, die Minima liegen

jeweils am Ende der Lichtzeit zwischen 12. und 14. Std. Dieses Maximum fällt etwa mit dem Maximum der Sauerstoffproduktion im Synchronzyklus von Chlorella zusammen (vgl. Abb. 19). Für Scenedesmus und Chlamydomonas wurde es bereits von FRICKEL-FAULSTICH und SENGER (1974) gefunden.

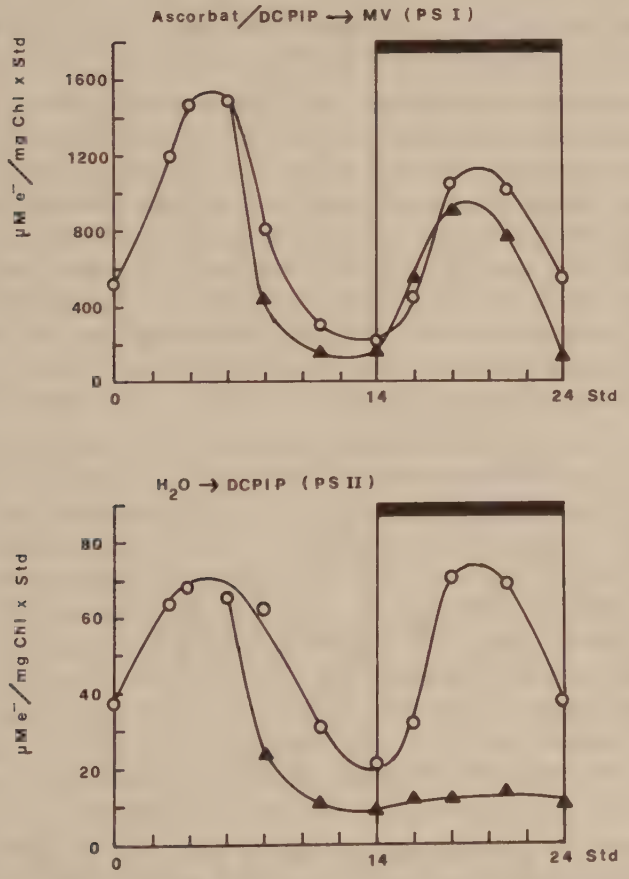

Abb. 47: Aktivitäten (µMol transportierte Elektronen / mg Chlorophyll und Std) von PS I (oben) und PS II (unten) im Verlauf des Synchronzyklus und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C).

o——o Normal

▲——▲ Kälteschock

In Abweichung davon besitzen beide Photosysteme ein zweites Aktivitätsmaximum unmittelbar vor der Autosporenfreisetzung während der Dunkelphase zur 18. - 20. Std. Dieses zweite Maximum, für das wir bisher keine Erklärung geben können, wurde mit verschiedenen Tests bestätigt (TISCHNER 1974, NELLE et al. 1975).

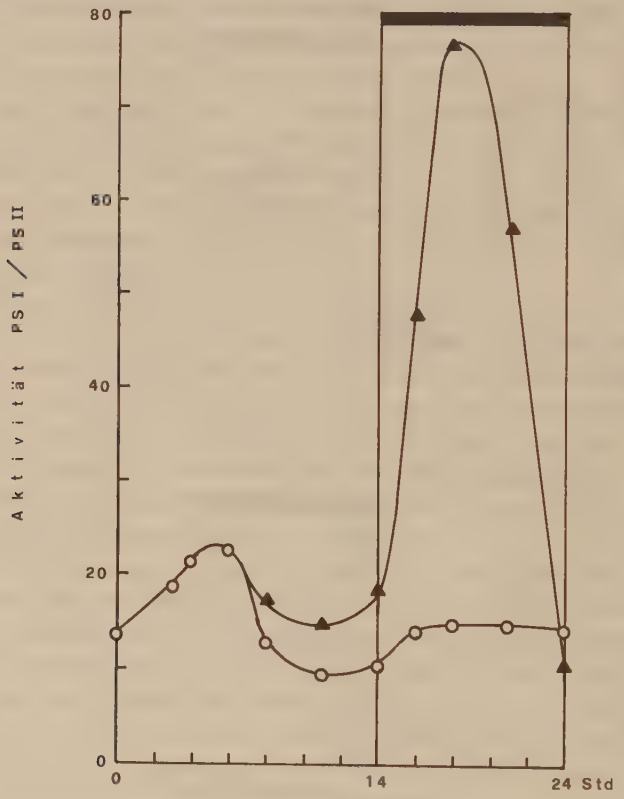

Abb. 48: Verhältnis der Aktivitäten von PS I und PS II im Verlauf des Synchronzyklus und nach Kälteschock (2 Std 4,5°C).

o——o Normal

▲——▲ Kälteschock

In Abb. 48 ist das Verhältnis der Aktivitäten PS I / PS II im Verlauf des Synchronzyklus dargestellt. Wir finden wiederum ein Maximum im Bereich der 4. - 6. Std, dann fällt die Kurve bis zu einem Minimum in der 11. Std ab, um in der Dunkelzeit wieder leicht bis zu einem anfänglichen Wert anzusteigen. Die PS I-Aktivität nimmt also zu Beginn des Zyklus relativ stärker zu als die von PS II; die absoluten Werte sind dabei ohne Bedeutung. Nach dem Maximum um die 6. Std wird die PS II-Aktivität wieder relativ größer.

Die direkten Ursachen bzw. die Regulationsmechanismen für die Veränderungen in den Photosystem-Aktivitäten sind noch nicht eindeutig geklärt. SENGER (1970 b) fand während des Synchronzyklus charakteristische Veränderungen in der Quantenabsorption des Pigmentsystem II, ebenso könnten aber auch enzymlimitierende Bedingungen vorliegen (vgl. MYERS and GRAHAM 1975, S. 93). Allgemein wird die Reoxidationskapazität des Plastochinons als geschwindigkeitsbestimmender Faktor im photosynthetischen Elektronentransport angesehen (WITT 1971, FRICKEL-FAULSTICH und SENGER 1974).

Vergleicht man die Kurve der Partikel-Aktivitäten PS I / PS II mit den Tieftemperatur-Fluoreszenz-Emissionsspektren und dem Verhältnis F_{722} / F_{690} (Abb. 46), die das Pigmentverhältnis im PS I / PS II wiedergeben, so findet man einen gegensätzlichen Verlauf: In der 11. Std des Zyklus findet man für die Partikel PS I / PS II-Aktivität ein Minimum, für die Pigment-Fluoreszenz PS I / PS II ein Maximum. Dieser Gegensatz könnte einmal auf Artefaktbildungen als Folge der Partikelpräparation beruhen. Ebenso ist nicht auszuschließen, daß die Messungen "in vitro" mit Elektronendonatoren, Akzeptoren sowie notwendigen Cofaktoren nicht unbedingt die Verhältnisse "in vivo" widerspiegeln (BERZBORN und BISHOP 1972). Wir nehmen jedoch an, daß die gegensätzlichen Verhältnisse zwischen PS I / PS II-Pigmenteigenschaften (gemessen an ganzen Algen) und den entsprechenden PS I / PS II-Elektronentransport-Aktivitäten (gemessen an Partikeln) den natürlichen Verhältnissen in der Zelle entsprechen. Unsere Beobachtungen können einmal durch eine Anhäufung photosynthetisch inaktiver Pigmentzentren im Laufe der fortschreitenden

Lichtzeit erklärt werden. Ebenso ist aber auch eine Verschiebung in der Verteilung der absorbierten Lichtenergie von den akzessorischen Pigmenten zu den Reaktionszentren der beiden Photosysteme möglich. Prinzipiell könnte man eine Bestätigung des PS I / PS II-Verhältnisses durch eine Untersuchung der DCMU-Hemmung im Synchronzyklus erhalten. Die Menge DCMU/Chlorophyll, die für 50%ige Hemmung der Photosynthese nötig ist, schwankt parallel zum Verhältnis der Partikel-Aktivitäten von PS I / PS II. Allerdings muß noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die Permeabilität von DCMU im Laufe des Synchronzyklus sich stark verändert (vgl. S.73), so daß dieses Argument nicht völlig überzeugen kann.

Haben die Aktivitäten der Photosysteme I und II im Synchronzyklus einen ähnlichen Verlauf (zwei Maxima), so bestehen für kältegeschockte Algen große Unterschiede. PS I ist zunächst relativ unempfindlich gegen die Schockwirkung, seine Aktivitätskurve durchläuft wie die der Normalkultur das zweite Maximum in der Dunkelzeit. Die Aktivität von PS II fällt unmittelbar nach dem Schock bis zum Ende der Lichtzeit stark ab. Während der Dunkelphase erfolgt dann keine weitere Aktivitätsverminderung mehr. Parallelversuche mit DPC als Elektronendonator brachten prinzipiell gleichartige Ergebnisse, so daß die Sensiblität des PS II sich nicht allein auf die Wasserspaltung beschränken kann (vgl. HEBER et al. 1973). Gegen Ende des Zyklus macht sich dann auch eine deutliche Schädigung des PS I bemerkbar (Abb. 48). Das Maximum in der Dunkelzeit zeugt von der zunächst relativ größeren Empfindlichkeit des PS II, der starke Abfall bis unter den Wert der Normalkultur von der später auftretenden Empfindlichkeit des PS I. Nach 24 Std beträgt der Abfall der PS-Aktivität der Schock-Kultur gegenüber Normal bei PS I ca. 80 %,bei PS II nur ca. 70 %.

Es wurde ferner die Bedeutung von Verdunklung bzw. Stickstoffbegasung während der Kältebehandlung für die Schädigung der Photosysteme geprüft (vgl. Kap. I). Tab. 20 gibt die nach 24 Std gemessenen Aktivitäten an. Das Ergebnis bestätigt alle bisherigen Erkenntnisse. Die Aufhebung der Kälteschock-

Tab. 20

PS I und PS II Aktivitäten (in µm e^-/mg Chl x Std) zur 24. Std in Abhängigkeit von der Behandlung während der empfindlichen Phase

Behandlung	PS I	PS II
Normal	490	35
Kälte-Licht	105	8
Kälte-Dunkel	537	33
Kälte-Licht-Stickstoff	438	26

Wirkung durch Verdunklung oder Stickstoffbegasung, die bisher für den Pigmenthaushalt, Zellentwicklung und photosynthetische Sauerstoffbildung nachgewiesen wurde, betrifft auch die beiden Photosysteme.

DISKUSSION

Bei der Abhandlung der Ergebnisse wurde in den meisten Fällen bereits im Sachzusammenhang auf die wichtigste Literatur eingegangen, so daß hier auf eine erneute ausführliche Diskussion verzichtet werden kann. Über die Vorgänge in der Zelle nach dem Schock und während der Regeneration sollen noch einige, wesentlich erscheinende Punkte erörtert werden.

Im normalen Synchronzyklus von Chlorella wurden im Laufe der Untersuchungen zwei wichtige Phasen festgestellt, in denen die Zelle großen Umstellungen ihres Stoffwechsels unterliegt: Im Bereich der 4. - 6. Std des Zyklus beginnt der stärkste Anstieg der Zellkomponenten TG, KH, Pr und Pigmente (Abb. 26, 27, 28), die PS I- und PS II-Aktivitäten weisen sowohl absolut als auch in ihrem Verhältnis ein Maximum auf (Abb. 47, 48), ebenso die photosynthetische Sauerstoffproduktion und die Dunkelatmung (Abb. 35, 36). Der Quotient der Fluoreszenzsignale $F_{435 \rightarrow 684} / F_{470 \rightarrow 684}$, ein Indikator für das Verhältnis Chl a / Chl b, wie auch das Verhältnis der Pigmente selbst, zeigen gleichfalls ein Maximum. Darüber hinaus ist dieser Bereich auch in anderer Hinsicht bedeutungsvoll: So hat z.B. die NADP-abhängige Glucose-3-Phosphat-Dehydrogenase in der 6. Std das Maximum ihrer Aktivität (TISCHNER and LORENZEN 1974), außerdem liegt in diesem Zeitabschnitt das Maximum im Verhältnis ATP/ADP (TISCHNER und LORENZEN 1975) und die größte Empfindlichkeit von Chlorella gegen kurzzeitige Hochtemperaturschocks (TISCHNER 1974).

Im ähnlichen Maße ist der Zeitabschnitt um die 10. - 12. Std des Lebenszyklus für die Stoffwechselvorgänge der Zelle besonders hervorgehoben: Der Zuwachs von KH, Pr und Pigmente sowie der des TG läßt deutlich nach, die Aktivitäten von PS I und PS II, ihr Verhältnis, die photosynthetische Sauerstoffproduktion und die Dunkelatmung sind im Minimum. Außerdem ist dieser Bereich durch eine starke DNS-Synthese (WANKA 1968) und den Beginn der Kernteilungen (LORENZEN and HESSE 1974) charakterisiert.

Zwischen diesen beiden, für den Stoffwechsel der Zelle so wichtigen Bereichen liegt die höchste physiologische Aktivität der Zelle (RUPPEL 1962). Es ist bekannt, daß eine hohe Sensibilität häufig mit höchster stoffwechselphysiologischer Aktivität korreliert ist (u.a. SATO and TAKAHASHI 1968 b, vgl. auch Abb. 22, 23). Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß eine Empfindlichkeit in diesem Zeitraum auftritt und während der Dauer dieser Phase anhält. Dies wurde durch geeignete Versuchsbedingungen - längere Lichtzeiten nach dem Schock - bestätigt: Erst gegen Ende der Lichtzeit (12. Std) nimmt die Sensibilität ab (Abb. 9). Im Standardversuch (Abb. 3) wird die empfindliche Phase durch die allmähliche Verkürzung der Nachbelichtungszeiten auf den vorderen Teil beschränkt. Der verminderte Lichtgenuß pro Zelle durch die Zunahme der optischen Dichte in der Kultur ist für die zunehmende Resistenz weit weniger von Bedeutung als die Verkürzung der Belichtungszeit nach dem Schock. Außerdem ist bekannt, daß z.B. Mitosen im fortgeschrittenen Stadium weniger empfindlich gegen tiefe Temperaturen sind (DAS et al. 1966, MURIN 1966).

Eine weitere Ursache für die verringerte Sensibilität könnte schließlich die mit zunehmendem Zellalter nachlassende Synchronisationsschärfe sein. Die Länge der kritischen Phase ist für die Einzelzelle immer gleich; in einer Kultur mit geringer Synchronisationsschärfe ist sie lang (zugleich ist die Empfindlichkeit verringert), bei hoher Synchronisationsschärfe ist sie kurz (die Empfindlichkeit ist erhöht). Gibt man den Kälteschock in der empfindlichen Phase, so trifft man bei einem sehr hohen Synchronisationsgrad alle Zellen etwa im gleichen Stadium. Bei einer theoretischen Synchronisationsbreite Null, d.h. alle Zellen sind absolut gleichaltrig, würde eine sehr viel kürzere Kältebehandlung ausreichend sein, die beschriebenen Schockwirkungen herbeizuführen. Da die Synchronisationsschärfe mit der Dauer der Lichtzeit abnimmt - in der Dunkelzeit nimmt sie dann wieder zu -, ist also mit fortgeschrittenem Zellalter (nach der 8. Std) die Sensibilität der Kultur herabgesetzt, obwohl die maximale Empfindlichkeit für einzelne Zellen noch besteht.

In dieser Arbeit ist immer von einem"Kälteschock" oder der "Kälteeinwirkung" die Rede, dennoch kann man eigentlich nicht von einem Kälteeffekt allein sprechen, da die Kälte nur im Zusammenhang mit bestimmten, während ihrer Anwendung herrschenden Bedingungen wirkt. Außerdem zeigen Untersuchungen bei veränderten exogenen Faktoren, daß der Zeitraum in der Mitte der Lichtzeit eine allgemein empfindliche Phase darstellt (Abb. 49). Die Bedingungen für den Standardschock sind allerdings so gewählt, daß die Effekte besonders deutlich sind.

Grundsätzlich muß unterschieden werden zwischen der Kältebehandlung selbst, d.h. einem induzierenden Vorgang, der mit tiefgreifenden Veränderungen in Struktur und Aktivitäten der Zelle verbunden ist und den Folgeprozessen. Innerhalb der zweistündigen Schockbehandlung kommt es erst nach Ablauf einer gewissen Induktionsphase (Temperaturadaptation) zu hemmenden bzw. schädigenden Wirkungen. Die ersten Auswirkungen des Kälteschocks betreffen wahrscheinlich die Zellstruktur, insbesondere die Membranen. Solche Strukturveränderungen durch Kältebehandlung sind von zahlreichen Objekten beschrieben worden.

So beobachtete man bei Tetrahymena nach einer Behandlung mit 5° C Aggregationen von Partikeln auf den Membranen und die Bildung von Löchern in den Membranen (SPETH and WUNDERLICH 1973, WUNDERLICH et al. 1973). Die biologischen Membranen werden offenbar bei tiefen Temperaturen durchlässiger. MINCHIN und SIMON (1973) sowie WRIGHT und SIMON (1973) untersuchten die Auswirkungen von tiefen Temperaturen auf Kürbisblätter und folgerten, daß die Zellmembranen bei 5° C einen physikalischen Wechsel erleiden, wodurch Photosynthese und Atmung reduziert werden und die Membranen stärker durchlässig für Wasser und Elektrolyte werden. HEBER et al. (1973) fanden für Spinatchloroplasten eine hohe Kälteempfindlichkeit der Wasserspaltung der Photosynthese und führen sie auf die besondere Sensiblität der Membranen zurück. Untersuchungen von THOMAS et al. (1972) an Spinat und Vischeria stellata erbrachten einen Zusammenhang zwischen aerobem "photobleaching" und Strukturveränderungen im Chloroplasten. TAYLOR und CRAIG (1971) fanden ebenfalls Veränderungen in der Struktur der

Chloroplasten in Abhängigkeit von Kältebehandlungen. Bei 10° C lösen sich die Thylakoide voneinander und die Zwischenräume werden größer. MÜNTZ (1971) schließlich sieht einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen kältebedingten Strukturveränderungen und dem Pigmentverlust bei Chlorella.

Wegen der Ähnlichkeit dieser Ergebnisse mit den hier vorliegenden bei Chlorella wird angenommen, daß als erste Wirkung der tiefen Temperatur Strukturveränderungen in Proteinkomplexen auftreten, die im Dunkel reversibel, im Licht durch

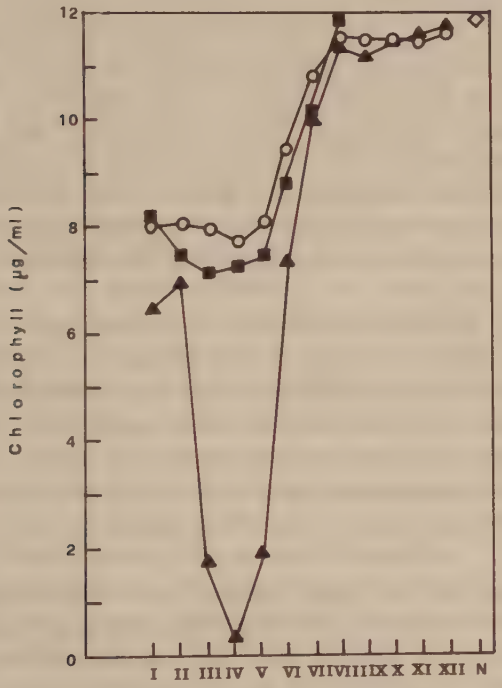

Abb. 49: Resistenzänderungen im Verlauf eines Synchronzyklus von Chlorella dargestellt am Chlorophyllgehalt nach 24 Std.
Versuchsanordnung vgl. Abb. 3.
▲——▲ 2 Std 4,5°C,Licht
○——○ 2 Std 4,5°C,Dunkel
■——■ 2 Std 32°C,Dunkel

Oxidationen z.B. von Disulfiden und Thioestern (KANDLER und SCHÖTZ 1956) irreversibel werden können. Als direkte Folgen werden Elektronentransportketten unterbrochen, Energietransfers gehemmt und Enzymaktivitäten reduziert. Möglicherweise werden auch latente Enzyme für den Abbau bestimmter Stoffe, etwa der Pigmente, aktiviert. Diese primären Wirkungen äußern sich in einer schnellen Schädigung der Atmung, die allerdings nicht total gehemmt wird und der photosynthetischen Sauerstoffproduktion, die bereits am Ende des zweistündigen Schocks fast ganz ausgeschaltet ist. Ursache einer etwas verzögerten Schädigung der PS II-Aktivität ist nicht die Sensibilität der Wasserspaltung allein; das zeigten Versuche mit DPC. Die ebenfalls bereits während der Schockbehandlung auftretenden Enzymhemmungen bleiben auch in der Zeit nach dem Schock bestehen, so daß bei keinem untersuchten Parameter (Pigmente, KH, Pr, TG) unter den nachfolgenden Normalbedingungen ein Zuwachs mehr zu verzeichnen ist. Die Hemmung der Zellentwicklung, welche sich spätestens in der Dunkelzeit durch völliges Ausbleiben der Sporulation dokumentiert, wird somit bereits während der Schockbehandlung induziert.

Im Zusammenhang mit den allgemeinen Strukturveränderungen beginnt auch eine langsame Zerstörung von Membranen, die sich aus Veränderungen der FS erkennen läßt und die weit über den Zeitraum des 1. LDW hinaus fortschreitet. Anhäufungen von oxidierten Stoffen, u.a. Abbauprodukte der Fette, hemmen ihrerseits den Photosyntheseapparat (HARNISCHFEGER 1972), was wiederum andere oxidative Prozesse begünstigt (KANDLER and SIRONVAL 1959).

Etwa 2 Std nach Ende des Kälteschocks beginnt der Pigmentabbau in der Reihenfolge Car - Chl - Ges.X. Diese Reihenfolge findet sich auch bei KANDLER und SIRONVAL (1959) und bestätigt die Erfahrung, daß oxidierte Pigmentformen gegen Licht widerstandsfähiger sind (RUDOLPH und BUKATSCH 1967). Neben einer Zerstörung von Farbstoffmolekülen kann man auch annehmen, daß im Rahmen eines ständigen turnovers der Pigmente der Abbau verstärkt oder die Neusynthese vermindert wird (HAGER 1957 b). CLAES (1961) und MÜNTZ (1971) sehen den Pigmentverlust eben-

falls als eine Störung im Gleichgewicht von Synthese und Abbau, die ihrerseits wiederum eine Folge von Strukturveränderungen ist.
Von großer Bedeutung für die totale Schädigung der Pigmente ist das Ausschalten natürlicher Schutzmechanismen. In vivo liegen die Chlorophylle zusammen mit Proteinen, Lipiden und Carotinoiden als relativ stabiler Komplex vor. Durch eine Reihe von natürlichen Antioxidantien, z.B. Ascorbinsäure, Peroxidasen (RUDOLPH und BUKATSCH 1967) oder NADPH (KURAISHI et al. 1968) werden die Chlorophylle vor oxidativer Zerstörung durch zu starkes Licht geschützt. Es ist eine allgemein akzeptierte Tatsache, daß auch die Carotinoide einen wichtigen Schutz für die Chlorophylle darstellen, wenngleich der molekulare Mechanismus dieses Prozesses noch nicht eindeutig geklärt ist. In zahlreichen Fällen wird "photobleaching" durch die Anwesenheit von Carotinoiden verhindert (u.a. ANDERSON and ROBERTSON 1959, vgl. auch S.71).

KANDLER und SCHÖTZ (1956) z.B. registrierten starke photooxidative Pigmentzerstörungen bei carotinoidfreien Mutanten von Chlorella. DWORKIN (1960) arbeitete mit carotinoidfreien Mutanten von Rhodopseudomonas und fand bei diesen im Gegensatz zu den normalen Organismen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Licht (10000 Lux) und Sauerstoff. CLAES konnte sowohl in vitro (CLAES und NAKAYAMA 1959) als auch in vivo (CLAES 1962) die Schutzfunktion von Carotinoiden nachweisen. Danach wirken die Carotinoide, indem sie die Anregungsenergie vom Chlorophyll ableiten. Dieser Vorgang ist unabhängig vom Sauerstoff; Voraussetzung für die Energieübertragung ist eine Mindestanzahl von Doppelbindungen.
Erster Schritt der Chlorophyllschädigung ist wahrscheinlich die Bildung eines angeregten Chlorophyllmoleküls (CALVIN 1955, HAGER 1957 b, 1975) an dem die Weiteroxidation einsetzt, sobald die Carotinoide die Energie nicht mehr vom Chlorophyll ableiten können. Nur die in normalen Zellen vorliegende räumliche Anordnung von Chlorophyllen und Carotinoiden ermöglicht ein Zusammenspiel, das zur Ableitung der absorbierten Energie führt. Eine Störung dieser Anordnung, wie sie durch den Kälteschock erfolgt, bedingt eine mehr oder weniger starke photo-

dynamische Wirkung, die den Stoffwechsel hemmt und schließlich zur Oxidation der Farbstoffe führt (vgl. KANDLER und SCHÖTZ 1956). Innerhalb der Chl a-Formen wurden unterschiedliche Empfindlichkeiten in Abhängigkeit von ihrer Bindung an den Pigment-Protein-Komplex festgestellt, die mit anderen Ergebnissen übereinstimmen (vgl. u.a. THOMAS and NIJHUIS 1968). Der Abbau aller Pigmente ist in der Regel nach 24 Std weitgehend abgeschlossen. Spätestens in der 4. Std des zweiten LDW nach dem Kälteschock ist kein Pigment mehr nachweisbar.
Während der Dunkelzeit des ersten Zyklus beginnt eine starke Hemmung der bis dahin relativ normal ablaufenden PS I-Kapazität, die bis zum Ende des Zyklus schließlich einen höheren Grad als beim PS II erreicht hat. Die Zellbestandteile KH und Pr sowie TG bleiben nach dem Schock zunächst konstant. Eine in der Dunkelzeit beginnende Verringerung, die beim KH am stärksten ist, setzt sich im 2. LDW etwas verstärkt fort und hält bis zur 48. Std an.
In seinen Auswirkungen ähnelt der Kälteschock sehr einer starklichtinduzierten Photooxidation. Es wird deshalb auch angenommen, daß der Mechanismus der Schädigung hier prinzipiell der gleiche ist. Die Empfindlichkeit gegenüber relativ schwachem Licht ist unter unseren Bedingungen allerdings erst gegeben, nachdem Strukturveränderungen durch die Kälte eingeleitet wurden.

Erstes Merkmal einer Regeneration ist bereits zu Beginn des 2. LDW der Anstieg der Atmung. Eine völlige Normalisierung ist jedoch auch im 3. LDW noch nicht erreicht. Der Vorgang der Regeneration der Membranstrukturen zieht sich über einen sehr langen Zeitraum hin, wie aus FS-Analysen und Absorptionsspektren hervorgeht. Im 2. LDW, insbesondere in seiner Dunkelzeit, führt die Regeneration der Pigmente schnell zu einer Normalisierung der Chlorophyllverhältnisse (Abb. 41). Im 3. LDW entspricht der Zuwachs der einzelnen Pigmente in etwa dem einer Normalkultur. Parallel dazu nimmt die Photosynthesekapazität in der Dunkelzeit des 2. LDW stark zu und ist im 3. LDW wieder normal.

Mit Beginn des 3. LDW setzt wieder eine starke, normalisierte Produktion von KH, Pr und TG ein. Die gesamten Vorgänge des Zellwachstums und der Zellentwicklung sind im 3. LDW zwar noch nicht optimal koordiniert, führen aber immerhin in der 20. Std zu einer deutlichen Zellvermehrung. Im 4. LDW ist die volle Synchronisation der Kultur wiederhergestellt. Die Regeneration ist somit an einen Wechsel von Licht- und Dunkelzeiten gebunden, durch den die Wiederherstellung von Elektronentransportketten und Enzymaktivitäten sowie Strukturen in der Zelle ermöglicht wird.
Abb. 50 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die zeitliche Reihenfolge in den Auswirkungen des Kälteschocks und in der Regeneration wieder.

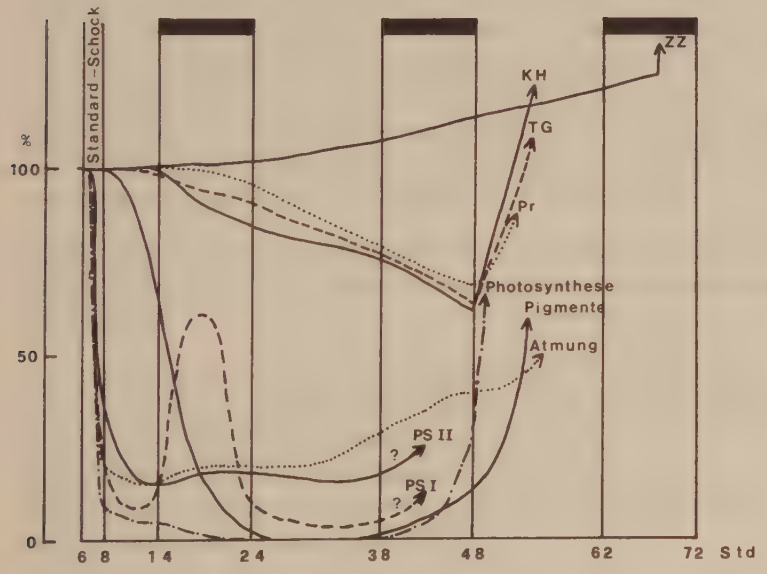

Abb. 50: Zeitliche Reihenfolge der Auswirkungen des Kälteschocks auf die untersuchten Parameter und der Regeneration.
Die Kurven wurden normalisiert: Werte der 6.Std (vor dem Kälteschock) = 100%.

Unsere Ergebnisse über die Auswirkungen des Kälteschocks bei Chlorella könnten eine wesentliche Ergänzung durch genauere Untersuchungen der Zellstruktur erfahren. Veränderungen, insbesondere im Membransystem des Chloroplasten, während des Ausbleichens und des Wiederergrünens könnten im Vergleich mit den vorliegenden physiologischen Ergebnissen zu weitergehenden Befunden führen. Eine Weiterführung der Untersuchungen dieser Thematik müßte deshalb in jedem Falle mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen beginnen.
Die Ergebnisse der Tieftemperaturspektren haben außerdem gezeigt, daß der Kälteschock, seine Folgen und die Regeneration bei Chlorella für weitere Untersuchungen über Abbau und Neusynthese verschiedener Chlorophyllformen mit Hilfe von Computeranalysen (vgl. FRENCH 1970, 1971) geeignet ist.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Synchronzyklus von Chlorella pyrenoidosa 211-8b (LDW 14:10) wurde eine Phase zwischen der 5. und 11. Std gefunden, in der die Zellen eine hohe Empfindlichkeit gegen Kälteschocks aufweisen. Diese empfindliche Phase befindet sich in einem Bereich hoher stoffwechselphysiologischer Aktivität. Bei Anwendung des Standard-Schocks (2 Std 4,5° C im Licht) liegt die höchste Empfindlichkeit in der 7. und 8. Std des Zyklus. Deutlichste Schockwirkung ist ein starkes Ausbleichen der Zellen. Eine Empfindlichkeit wurde für 4 weitere einzellige Grünalgen aufgefunden.

2. Die Schockwirkung ist abhängig von der Lichtintensität während der Behandlung und der Intensität und Dauer der Nachbelichtung. Im Dunkel ist die Kälte ohne ersichtliche Wirkung. In einem Intensitätsbereich zwischen 6 und 12 x 10^4 erg/Sek x cm^2 ist das Ausbleichen ein Produkt aus Lichtintensität und Schockdauer. Blaulicht schädigt stärker als Rotlicht. Zwölfstündige Verdunklung im unmittelbaren Anschluß an den Schock verhindert das Ausbleichen.

3. Stickstoffbegasung während der Kältebehandlung reduziert die Effekte stark; die Kälte wirkt nur im Zusammenhang mit Sauerstoff.

4. Für das Ausbleichen ist eine Schockdauer von 2 Std notwendig, kürzere Schocks haben keine volle Wirkung, längere Schocks (3 Std) wirken letal.
Durch Zusatz bestimmter Chemikalien (Glycerin, $MgCl_2$, Na_2SO_3) oder durch Verwendung eines Carotinfilters kann die Schockwirkung reduziert werden.

5. Für eine Regeneration ist ein Wechsel von Licht und Dunkel notwendig, der im 4. LDW wieder zur Vollsynchronisation führt. Bereits im 3. LDW erfolgt eine deutliche Regeneration aller Zellen. Wurden die Zellen nach dem Kälteschock mit DL behandelt, so starben sie ab. Eine Abhärtung tritt

weder bei kältevorbehandelten noch bei kältegeschockten und regenerierten Zellen auf.

6. Der Verlauf der Schockwirkung und der Regeneration wurde an verschiedenen Parametern untersucht, ihre zeitliche Reihenfolge aufgestellt und mit dem Verlauf im normalen Synchronzyklus verglichen.
Zellwachstum und -vermehrung sind zunächst völlig gehemmt. Der Gehalt an KH, Pr und TG nimmt nach dem Schock verzögert bis zum Ende des 2. LDW ab, im 3. LDW steigt er wieder an.

7. Durch den Kälteschock werden insbesondere ungesättigte, längerkettige FS abgebaut, im Verlauf der Regeneration werden sie mit Verzögerung wieder synthetisiert.

8. Für die Pigmente wurde eine Zunahme der Empfindlichkeit in der Reihenfolge Ges.X - Chl - Car festgestellt. Aus Tieftemperatur-Absorptionsspektren läßt sich auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Chl-Formen und damit auch der Photosysteme ableiten. Im Absorptionsspektrum des Gesamtpigmentextraktes macht sich die Schockwirkung durch eine charakteristische Verschiebung des Maximums bei 440 nm nach 410 nm bemerkbar, was auf die Bildung von Peroxiden, Chlorophylliden und Phäophytin zurückzuführen ist. Eine Regeneration der Pigmente beginnt bereits langsam im 2. LDW und setzt sich verstärkt im 3. LDW fort.

9. Die Sauerstoffproduktion ist bereits direkt nach dem Schock sehr stark gehemmt, ihre Regeneration beginnt in der Dunkelzeit des 2. LDW. Die Dunkelatmung ist weniger stark gehemmt und steigt bereits in der Lichtzeit des 2. LDW wieder an.
Fluoreszenz-Anregungsspektren und Fluoreszenz-Emissionsspektren kältegeschockter Algen lassen auf eine Störung der normalen Lage der Pigmentmoleküle zueinander schließen, wodurch der Energietransfer unterbrochen wird.
PS II wird durch den Kälteschock schneller geschädigt; gegen Ende des 1. LDW ist die PS I-Schädigung stärker.

10. Nachdem der Organismus durch die Kälte sensibilisiert wurde, führt Licht relativ geringer Intensität (20000 Lux) zu photooxidativen Prozessen, wie sie sonst nur vom Starklicht bekannt sind.

LITERATUR

AACH, H.G., 1953: Über Abbau und Regeneration der Chloroplastenfarbstoffe bei Chlorella. - Arch. Mikrobiol. 19, 166-173

ADLER, K., 1967: Spezifische Rolle der Carotinoidabsorption bei der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung. - Planta 75, 220-227

AMIN, J.V., 1969: Some aspects of respiration and respiration inhibitors of low temperature effects of cotton plants. - Physiol. Plant. 22, 1184-1191

ANDERSON, I.C. and D.S. ROBERTSON, 1959: Carotenoid protection of chlorophyll photodestruction. - Proc. IX. Int. Bot. Congr. II, 6

ARMSTRONG, J. McD., 1964: The molar extinction coefficient of 2,6 DCPIP. - Biochim. Biophys. Acta 86, 194-205

BENSON, A.A., J.F.G.M. WINTERMANS, and R. WISER, 1959: Chloroplast lipids as carbohydrate reservoirs. - Plant Physiol. 34, 315-317

BERZBORN, R.J. und N.J. BISHOP, 1972: Isolierung und Charakterisierung von Chloroplastenfragmenten aus synchronen Scenedesmus-Kulturen. - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 85, 415-424

BLASS, U., J.M. ANDERSON, and M. CALVIN, 1959: Biosynthethesis and possible relations among the carotenoids and between chlorophyll a and b. - Plant Physiol. 34, 329-333

BLIGH, E.G. and W.J. DYER, 1959: A rapid method of total lipid extraction and purification. - Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917

BROWN, J.S., 1969: Factors affecting absorption and fluorescence spectra of natural chlorophyll complexes. - Carnegie Institution Year Book 67, 528-534

BROWN, J.S. and L. PRAGER: Absorption and fluorescence of fractions from several plants. - Carnegie Institution Year Book 67, 516-520

BUSCHBECK, R., 1967: Spezifische Wirkung einer kurzfristigen Kältebehandlung auf die Atmungsintensität von Keimwurzeln winterannueller Brassicaceen. - Flora 158 A, 594-598

CALVIN, M., 1955: Function of carotinoids in photosynthesis. - Nature 176, 1215

CHO, F. and GOVINDJEE, 1970 a: Fluorescence spectra of Chlorella in the 295 - 77° K range. - Biochim. Biophys. Acta 205, 371-378

CHO, F. and GOVINDJEE, 1970 b: Low-temperature (4 - 77° K) spectroscopy of Chlorella; temperature dependence of energy transfer efficiency. - Biochim. Biophys. Acta 216, 139-150

CHO, F., J. SPENCER, and GOVINDJEE, 1966: Emission spectra at very low temperatures (-269° to -196°). - Biochim. Biophys. Acta 126, 174-176

CLAES, H., 1961: Energieübertragung von angeregtem Chlorophyll auf C_{40}-Polyene mit verschiedenen chromophoren Gruppen. - Z. Naturforsch. 16b, 445-454

CLAES, H., 1962: Untersuchungen an Chlorella-Mutanten: Die Energie-Übertragung von angeregtem Chlorophyll auf Carotinoide. - Vortr. Ges. Geb. Bot. N.F. 1, 109-115

CLAES, H. und T.O.M. NAKAYAMA, 1959: Das photooxidative Ausbleichen von Chlorophyll in vitro in Gegenwart von Carotinen mit verschiedenen chromophoren Gruppen. - Z. Naturforsch. 14b, 746-747

DAS, T.M., A.C. HILDEBRANDT, and A.J. RIKER, 1966: Cine-photomicrography of low temperature effects on cytoplasmatic streaming, nucleolar activity and mitosis in single tobacco cells in microculture. - Amer. J. Bot. 53, 253-259

DÖHLER, G., 1962: Rhythmische Veränderungen der Chloroplasten-Fluoreszenz bei synchron kultivierter Chlorella pyrenoidosa und deren Beeinflussung durch osmotischen Wasserentzug. - Vortr. Ges. Geb. Bot. N.F. 1, 201-204

DÖRING, G., J.L. BAILEY, W. KREUTZ, and H.T. WITT, 1968: The active chlorophyll-a_{II} in light reaction II of photosynthesis. - Naturwiss. 55, 220

DOMANSKI-KADEN, J. und W. SIMONIS, 1972: Veränderungen der Phosphatfraktionen, besonders des Polyphosphates, bei synchronisierten Ankistrodesmus braunii-Kulturen. - Arch. Mikrobiol. 87, 11-28

DONZE, M. and L.N.M. DUYSENS, 1969: Forms of reaction center II as deduced from low temperature fluorescence changes. - Progr. Photosynthesis Res., Vol. II, 991-995

DWORKIN, M., 1960: The effect of dark, aerobic growth on the photosensitivity of carotenoidless Rhodopseudomonas spheroides. - Biochim. Biophys. Acta 39, 88-92

EGLE, K., 1960: Apparente und reelle Photosynthese, Gaswechselgleichgewicht, Lichtatmung. - Handb. Pflanzenphysiol. V, 1, 182-210 (Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg)

EFTHIMION, M.H. and W.A. CORPE, 1969: Effect of cold temperatures on the viability of Chromobacterium violaceum. - Appl. Microbiol. 17, 169-175

FARELL, J. and A.H. ROSE, 1968: Cold shock in a mesophilic and a psychrophilic pseudomonad. - J. gen. Microbiol. 50, 429-439

FRANCK, J. and C.S. FRENCH, 1942: Photooxidation processes in plants. - J. gen. Physiol. 25, 309-324

FRENCH, C.S., 1957: Derivative spectrophotometrie. - Proc. Instr. Soc. Am. 8, 83-94

FRENCH, C.S., 1960: The chlorophylls in vivo and in vitro. - Handb. Pflanzenphysiol. (Hrsg. W. RUHLAND) V, 252-297 (Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg)

FRENCH, C.S., 1970: The forms of chlorophyll a in fractions of chloroplasts from different sources. - Carnegie Institution Year Book 68, 578-587

FRENCH, C.S., 1971: The distribution and action in photosynthesis of several forms of chlorophyll. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2893-2897

FRENCH, C.S., J.S. BROWN, W. WIESSNER, and M.C. LAWRENCE, 1971 a: Four common forms of chlorophyll a. - Carnegie Institution Year Book 69, 662-670

FRENCH, C.S., J.S. BROWN, and M.C. LAWRENCE, 1971 b: The forms of chlorophyll in chloroplast fractions of various algae. - Carnegie Institution Year Book 70, 487-495

FRICKEL-FAULSTICH, B. und H. SENGER, 1972: Änderungen der DCMU-Empfindlichkeit während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus. - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 85, 401-408

FRICKEL-FAULSTICH, B. und H. SENGER, 1974: Regulation des photosynthetischen Elektronentransports zwischen Photosystem II und Photosystem I. - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 87, 443-456

GALLING, G., 1963: Analyse des Magnesium-Mangels bei synchronisierten Chlorellen. - Arch. Mikrobiol. 46, 150-184

GALLING, G., M. RÖSSLER-HEDENSKOG und H. LORENZEN, 1975: Endogene Produktivitätsschwankungen bei Scenedesmus acutus und ihre Beziehung zum Nucleinsäure-Stoffwechsel. - Planta 124, 219-229

GIMMLER, H. and M. AVRON, 1971: On the mechanism of benzoquinone penetration and photoreduction by whole cells. - Z. Naturforsch. 26b, 585-588

GOEDHEER, J.C., 1972: Fluorescence in relation to photosynthesis. - Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 87-112

GOODWIN, W., 1955: Carotenoids.-In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse 3, 272-312 (Hrsg. K. PAECH und M.V. TRACEY)

GOVINDJEE, 1972: Discussions on chlorophyll fluorescence in vivo: techniques and applications. - In: Chloroplast Fragments, pp. 17-45 (Ed. G. JACOBI, Göttingen)

GRAHAM, D. and R.M. SMILIE, 1971: Chloroplasts (and Lamellae): algal preparations. - In: Methods in Enzymology (Ed. A. SAN PIETRO) 23, 228-242

GRIMME, L.H. and N.K. BOARDMAN, 1972: Photochemical activities of particle fractions P_1 derived from green alga Chlorella.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1617-1623

GRIMME, L.H. and R.J. PORRA, 1974: The regreening of nitrogen-deficient Chlorella fusca. I. The development of photosynthetic activity during the synchronous regreening of nitrogen-deficient Chlorella. - Arch. Microbiol. 99, 173-179

HAGER, A., 1957 a: Zur Chromatographie der lipoidlöslichen Blattfarbstoffe. - Planta 48, 592-621

HAGER, A., 1957 b: Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den Blattfarbstoffgehalt höherer Pflanzen. - Planta 49, 524-560

HAGER, A., 1967: Untersuchungen über die lichtinduzierten reversiblen Xanthophyllumwandlungen in Chlorella und Spinacea. - Planta 74, 148-172

HAGER, A., 1970: Ausbildung von Maxima im Absorptionsspektrum von Carotinoiden im Bereich um 370 nm; Folgen für die Interpretation bestimmter Wirkungsspektren. - Planta 91, 38-53

HAGER, A., 1975: Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyllumwandlungen im Chloroplasten. - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 88, 27-44

HAGER, A. und T. BERTENRATH, 1962: Verteilungschromatographische Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden grüner Pflanzen an Dünnschichten. - Planta 58, 564-568

HAGER, A. und T. MEYER-BERTENRATH, 1966: Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden. - Planta 69, 198-217

HALLIER, U.W. and R.B. PARK, 1969: Photosynthetic light reactions in chemically fixed Anacystis nidulans, Chlorella pyrenoidosa and Porphyridium cruentum. - Plant Physiol. 44, 535-539

HARNISCHFEGER, G., 1972: Photosensitized inhibitor formation in isolated, aging chloroplasts. - Planta 104, 316-328

HARNISCHFEGER, G., 1974 a: Studies on the effect of diphenylcarbazide in isolated chloroplasts from spinach. - Z. Naturforsch. 29b, 705-709

HARNISCHFEGER, G., 1974 b: Studies on photosynthetic pigments using fluorescence at liquid nitrogen temperatures: evidence for light induced pigment alignment in the photosynthetic apparatus. - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 87, 483-491

HAWKE, J.C., M.G. RUMBSBY, and R.M. LEECH, 1974: Liquid biosynthesis in green leaves of developing maize. - Plant Physiol. 53, 555-561

HEBER, U., 1958: Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. I. Mitteilung: Die Bedeutung der Zucker für die Frostresistenz. - Planta 52, 144-172

HEBER, U., L. TYANOVA, and K.A. SANTARIUS, 1973: Effects of freezing on biological membranes in vivo and in vitro. - Biochim. Biophys. Acta 291, 23-37

HEISE, K.P., 1972: Die Freisetzung von Lipiden aus Thylakoiden isolierter Chloroplasten von Spinacea oleracea. - Dissertation Göttingen, 70 S.

HELMSING, P.J., 1969: Purification and properties of galactolipase. - Biochim. Biophys. Acta 178, 519-533

HESSE, M., 1972: Endogene Rhythmik der Produktionsfähigkeit bei Chlorella und ihre Beeinflussung durch Licht. - Z. Pflanzenphysiol. 67, 58-77

HOSHINA, S., T. KAJI, and K. NISHIDA, 1975:Photoswelling and light-inaktivation of isolated chloroplasts. I. Change in lipid content in light-aged chloroplasts. - Plant & Cell Physiol. 16, 465-474

JACOBI, G., 1974: Chloroplasten. - In: Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle (Hrsg. G. JACOBI), pp. 72-108

KANDLER, O. und F. SCHÖTZ, 1956: Untersuchungen über die photooxidative Farbstoffzerstörung und Stoffwechselhemmung bei Chlorellamutanten und panaschierten Oenotheren. - Z. Naturforsch. 11b, 708-718

KANDLER, O. and C. SIRONVAL, 1959: Photooxidation processes in normal green Chlorella cells. II. Effects on metabolism. - Biochim. Biophys. Acta 33, 207-215

KIMBALL, S.L. and F.B. SALISBURY, 1973: Ultrastructural changes of plants exposed to low temperatures. - Amer. J. Bot. 60, 1028-1033

KISHITANI, S. and S. TSUNODA, 1974: Effect of low and high temperature pretreatment on leaf photosynthesis and transpiration in cultivars of Oryza sativa. - Photosynthetica 8, 161-167

KOK, B. and A. DATKO, 1965: Reducing power generated in the second photoact of photosynthesis. - Plant Physiol. 40, 1171-1177

KOWALLIK, W., 1962: Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereichs auf die Zusammensetzung und Zellteilung synchronisierter Chlorellen. - Planta 58, 337-365

KRINSKY, N.I., 1966: The role of carotenoid pigments as protective agents against photosensitized oxidations in chloroplasts. - In: Biochemistry of Chloroplasts (Ed. T.W. GOODWIN) 1, 423-430 (Academic Press)

KRINSKY, N.I., 1968: The protective function of carotenoid pigments.-In: Photophysiology, Current Topics (Ed. A.G. GIESE) 3, 123-195

KRINSKY, N.I., 1971: Function. - In: Carotenoids (Ed. O. ISLER), pp. 669-716 (Verlag Birkhäuser, Basel und Stuttgart)

KUHL, A., 1962: Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorganischer Phosphate in Chlorella. - Vortr. Ges. Geb. Bot. N.F. 1, 157-166

KUHL, A. and H. LORENZEN, 1964: Handling and culturing of Chlorella. - In: Methods in Cell Physiology 1, 159-187 (Academic Press)

KUIPER, P.J.C., 1964: Inducing resistance to freezing and desiccation in plants by decenylsuccinic acid. - Science 146, 544-546

KURAISHI, S., N. ARAI, T. USHIJIMA, and T. TAZAKI, 1968: Oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate levels of plants hardened and unhardened against chilling injury. - Plant Physiology 43, 238-242

LATTA, R., 1971: Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. - Canad. J. Bot. 49, 1253-1254

LEDERBOGEN, G., 1964: Der Verlauf im Gehalt von Plastidenpigmenten während der Entwicklung der Grünalgenzelle. - Staatsexamensarbeit Göttingen, 68 S.

LI, Y.-S., 1974: Low temperature fluorescence spectra of the wild type and of a chloroplast membrane mutant of Chlamydomonas reinhardi. The relationship between fluorescence reabsorption and membrane stacking. - Bot. Bull. Acad. Sinica 15, 96-102

LORENZEN, H., 1957: Synchrone Zellteilungen von Chlorella bei verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln. - Flora 144, 473-496

LORENZEN, H., 1959: Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender Chlorella bei langfristig intermittierender Belichtung. - Flora 147, 382-404

LORENZEN, H., 1962: Das Verhalten synchroner Kulturen von Chlorella pyrenoidosa an der oberen Temperaturgrenze des Wachstums. - Vortr. Ges. Geb. Bot. N.F. 1, 231-238

LORENZEN, H., 1963: Temperatureinflüsse auf Chlorella pyrenoidosa unter besonderer Berücksichtigung der Zellentwicklung. - Flora 153, 554-592

LORENZEN, H. und M. HESSE, 1968: Nachweis endogen bedingter Leistungsschwankungen bei Chlorella. - Z. Pflanzenphysiol. 58, 454-456

LORENZEN, H. and M. HESSE, 1974: Synchronous cultures.-In: Algal Physiology and Biochemistry (Ed. W.D.P. STEWART), pp. 898-908 (Blackwell Scientific Publ., Oxford, London)

LORENZEN, H. und H.G. RUPPEL, 1958: Periodische Resistenzänderung in einer synchronen Kultur von Chlorella. - Naturwissenschaften 45, 553-554

LORENZEN, H. und J. SCHLEIF, 1966: Zur Bedeutung der kürzest möglichen Generationsdauer in Synchronkulturen von Chlorella. - Flora 156 A, 673-683

LOVELOCK, J.E. and M.W. BISHOP, 1959: Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. - Nature 183, 1394-1395

LUNDLOW, C.J. and R.B. PARK, 1969: Action spectra for photosystems I and II in formaldehyde fixed algae. - Plant Physiol. 44, 540-543

MACHOLD, O., A. MEISTER und K. ADLER, 1971: Spektroskopische Eigenschaften von elektrophoretisch getrennten Chlorophyll-Protein-Komplexen der Photosysteme I und II aus Vicia faba und Chlorella pyrenoidosa. - Photosynthetica 5, 160-165

MACKELVIE, R.M., A.F. GROLUND, and J.J.R. CAMPBELL, 1968: Influence of cold-shock on the endogenous metabolism of Pseudomonas aeruginosa. - Canad. J. Microbiol. 14, 633-638

MACKINNEY, G., 1940: Criteria for purity of chlorophyll preparations. - J. biol. Chem. 132, 91-109

MACKINNEY, G., 1941: Absorption of light by chlorophyll solutions. - J. biol. Chem. 140, 315-322

MARVIN III, J.W. and E.P. KARLANDER, 1974: Characterization of bleaching in Chlorella induced by supraoptimal growth temperatures. - J. Phycol. 10, 24-28

MEISTER, A., 1966: Zur Untersuchung der verschiedenen Formen von Chlorophyll in der lebenden Pflanze durch Derivativ-Spektrophotometrie. - Kulturpflanze 14, 235-255

MEISTER, A. und T.G. MASLOVA, 1969: Spektroskopische Untersuchung der Formen von Chlorophyll im Blatt unter dem Einfluß einiger schädigender Faktoren. - Photosynthetica 3, 63-68

MELL, V., 1974: Herstellung subzellulärer, photosynthetisch aktiver Chloroplastenpartikel aus einzelligen Grünalgen. - Diplom-Arbeit Marburg, 46 S.

METZNER, H. und H. LORENZEN, 1960: Untersuchungen über den Photosynthese-Gaswechsel an vollsynchronen Chlorella-Kulturen. - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 73, 410-417

MICHEL-WOLWERTZ, M.-R., 1969: Effect of enzymatic digestion of chloroplast lamellae on chlorophyll absorption. - Carnegie Institution Year Book 67, 505-508

MICHEL-WOLWERTZ, M.-R. and J.-M. MICHEL, 1969: Absorption spectra of fractions obtained by sucrose gradient centrifugation from Chlorella pyrenoidosa. - Carnegie Institution Year Book 67, 514-520

MINCHIN, A. and E.W. SIMON, 1973: Chilling injury in cucumber leaves in relation to temperature. - J. exper. Bot. 24, 1231-1235

MÜNTZ,K., 1967: Über den Einfluß der Kälte auf Wachstum und Stoffwechsel von Chlorella pyrenoidosa Chik. - Symposium der Akademie vom 25.-29.9.1967 in Bukarest, 203-221

MÜNTZ,K., 1969: Über Wachstum und Stoffwechsel von Chlorella pyrenoidosa während Kälteeinwirkung im Dunkeln. - Flora 160, 139-157

MÜNTZ,K., 1971: Reversible Schäden im Pigmentsystem von Chlorella pyrenoidosa als Folge des Einfrierens der Zellen.- Photosynthetica 5, 32-37

MURATA,N., 1968: Fluorescence of chlorophyll in photosynthetic systems. IV. Induction of various emissions at low temperatures.- Biochim. Biophys. Acta 162, 106-121

MURIN,A., 1966: The effect of temperature on the mitotic cycle and its time parameters in root tips of Vicia faba. - Naturwissenschaften 12, 312-313

MYERS,J. and J.R. GRAHAM, 1975: Photosynthetic unit size during the synchronous life cycle of Scenedesmus. - Plant Physiol. 55, 686-688

NELLE,R., 1970: Einfluß exogener Faktoren auf die Kälteempfindlichkeit synchronisierter Chlorellazellen. - Staatsexamensarbeit Göttingen,58 S.

NELLE,R.,R.TISCHNER, G. HARNISCHFEGER and H. LORENZEN, 1975: Correlation between pigment systems and photosynthetic activity during the developmental cycle of Chlorella. - Biochem. Physiol. Pflanzen 167, 463-472

NIHEI,T., T. SASA, S. MIYACHI, K. SUZUKI and H. TAMIYA, 1954: Change of photosynthetic activity of Chlorella cells during the course of their normal life cycle. - Arch. Mikrobiol. 21, 156-166

PAPAGEORGIOU, G., 1975: Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. - In: Bioenergetics of Photosynthesis (Ed. GOVINDJEE), pp. 319-371 (Academic Press)

PATTERSON, G.W., 1970: Effect of culture temperature on fatty acid composition of Chlorella sorokiniana. - Lipids 5, 597-600

PIRSON, A., 1962: Synchronanzucht von Algen im Licht-Dunkel-Wechsel. (Ein Überblick). - Vortr. Ges. Geb. Bot. N.F. 1, 178-186

PIRSON, A., H. LORENZEN and A. KOEPPER, 1959: A sensitive stage in synchronized cultures of Chlorella. - Plant Physiol. 34, 353-355

POHL, P., H. GLASL und H. WAGNER, 1970: Zur Analytik pflanzlicher Glyko- und Phospholipoide und ihrer Fettsäuren. - J. Chromatogr. 49, 488-492

RIED, A., C.J. SOEDER und I. MÜLLER, 1963: Über die Atmung synchron kultivierter Chlorella. I. Veränderungen des respiratorischen Gaswechsels im Laufe des Entwicklungszyklus. - Arch. Mikrobiol. 343-358

ROE, J.H., 1955: The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. - J. biol. Chem. 212, 335-343

ROSENSTOCK, G. und A. RIED, 1960: Der Einfluß sichtbarer Strahlung auf die Pflanzenatmung. - Handbuch der Pflanzenphysiologie (Hrsg. W. RUHLAND) XII, 2 , 259-333 (Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg)

RUDDAT, M., 1961: Versuche zur Beeinflussung und Auslösung der endogenen Tagesrhythmik bei Oedogonium cardiacum Wittr. - Z. Botanik 49, 23-46

RUDOLPH, E. und F. BUKATSCH, 1967: Die Bedeutung von Ascorbinsäure, Katalase und Peroxidase für die Stabilisierung des Chlorophylls bei hohen Lichtintensitäten. - Flora 158 A, 443-457

RUPPEL, H.G., 1962: Untersuchungen über die Zusammensetzung von Chlorella bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel.- Flora 152, 113-138

SANTARIUS, K.A., 1969: Die Wirkung von Salzen auf isolierte Spinatchloroplasten im Zusammenhang mit Problemen der Frost- und Trockenresistenz bei Pflanzen. - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 82, 83-85

SATO, M., M. SUZUKI, and H. TAKAHASHI, 1968: Cold shock of germinating Bacillus subtilis spores. - Agric. biol. Chem. 32, 1270-1274

SATO, M. and H. TAKAHASHI, 1968 a: Cold shock of bacteria. I. General features of cold shock in Escherichia coli. - J. gen appl. Microbiol. 14, 417-428

SATO, M. and H. TAKAHASHI, 1968 b: Two critical temperature zones in the cold shock of Bacillus subtilis and Pseudomonas fluorescens. - Agric. biol. Chem. 32, 259-260

SCHLÖSSER, U., 1966: Enzymatisch gesteuerte Freisetzung von Zoosporen bei Chlamydomonas reinhardii Dangeard. - Arch. Mikrobiol. 54, 129-159

SCHMID, G.H. and H. GAFFRON, 1968: Photosynthetic units.- J. Gen.Physiology 52, 212-239

SCHWARZE, P., 1975: Beobachtungen über Kälteresistenz bei Chlorella vulgaris. - Biochem. Physiol. Pflanzen 167, 353-355

SENGER, H., 1970 a: Charakterisierung einer Synchronkultur von Scenedesmus obliquus, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthesequotienten während des Entwicklungszyklus. - Planta 90, 243-266

SENGER, H., 1970 b: Quantenausbeute und unterschiedliches Verhalten der beiden Photosysteme des Photosyntheseapparates während des Entwicklungsablaufes von Scenedesmus obliquus in Synchronkulturen. - Planta 92, 327-346

SENGER, H. and N.I. BISHOP, 1969: Changes in the photosynthetic apparatus during the synchronous life cycle of Scenedesmus obliquus. - Progress in Photosynthesis Research 1, 425-434

SENGER, H. and N.I. BISHOP, 1971: Changes in fluorescence and absorbance during synchronous growth of Scenedesmus. - II. International Congress on Photosynthesis, Stresa, pp. 677-687

SHIBATA, K., 1959: Spectrophotometry of translucent biological materials. Opalglas transmission method. - In: Methods in Chemical Analysis (Ed. D. GLICK), pp. 77-109 (Interscience Publ., N.Y.)

SIRONVAL, C. and O. KANDLER, 1958: Photooxidation processes in normal green Chlorella cells. I. The bleaching process.- Biochim. Biophys. Acta 29, 359-368

SMITH, J.H.C. and A. BENITEZ, 1955: Chlorophylls: analysis in plant materials. - In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse (Hrsg. K. PEACH and M.V. TRACEY), pp. 142-196 (Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg)

SOEDER, C.J., G. SCHULZE, and D. THIELE, 1966: A new type of "light inhibition", occuring in synchronous cultures of Chlorella. - Verh. int. Ver. Limnol. 16, 1595-1601

SOROKIN, C., 1957: Changes in photosynthetic activity in the course of cell development in Chlorella. - Physiol. Plant. 10, 659-666

SOROKIN, C., 1960: A reversible inhibition of photosynthesis in synchronized cultures of algae. - Nature 185, 933-935

SOROKIN, C., 1961: Effects of illuminance near and below light saturation on the time course of photosynthesis in synchronized cultures of algae. - J. exp. Bot. 12, 56-64

SPETH, V. and F. WUNDERLICH, 1973: Membranes of Tetrahymena II: direct visualisation of reversible transitions in biomembrane structure induced by temperature. - Biochim. Biophys. Acta 291, 621-628

STEPONKUS, P.L. and F.O. LANPHEAR, 1968: The role of light in cold acclimation of Hedera helix L. var. Thorndale. - Plant Physiol. 43, 151-156

STEWART, J.McD. and G. GUINN, 1969: Chilling injury and changes in adenosine triphosphate of cotton seedlings. - Plant Physiol. 44, 605-608

STRAIN, H.H., 1958: Chloroplast pigments and chromatographic analysis. - 32. Ann. Priestley Lectures, Pennsylvania State University

STRANGE, R.E., 1968: Bacterial "glycogen" and survival. - Nature 220, 606-607

STROTMANN, H. und C. von GÖSSELN, 1972: Photosystem I-abhängige Phosphorylierung isolierter Chloroplasten mit Ascorbat/2,6-Dichlorphenolindophenol als Elektronendonator und Methylviologen als Elektronenakzeptor. - Z. Naturforsch. 27b, 445-455

SUMIDA, S., R. YOSHIDA, and M. UEDA, 1975: Studies of pesticides on Chlorella metabolism. II. Effect of DCMU on galactolipid metabolism. - Plant & Cell Physiol. 16, 257-264

TAMIYA, H., T. IWAMURA, K. SHIBATA, E. HASE, and T. NIHEI, 1953: Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of Chlorella. - Biochim. Biophys. Acta 12, 23-40

TAYLOR, A.O. and A.S. CRAIG, 1971: Plants under climatic stress. II. Low temperature, high light effects on chloroplast ultrastructure. - Plant Physiol. 47, 719-725

TAYLOR, A.O. and J.A. ROWLEY, 1971: Plants under climatic stress. I. Low temperature, high light effects on photosynthesis. - Plant Physiol. 47, 713-718

THOMAS, J.B. and H.H. NIJHUIS, 1968: Relative stability of chlorophyll complexes in vivo. - Biochim. Biophys. Acta 153, 868-877

THOMAS, J.B., W.S.M. van de VEN, P.F. ELBERS and W.H. ECK, 1972: Aerobic photobleaching capacity as related to electron microscopical data on particle size distribution of chloroplast fragments of Vischeria stellata and Spinacia oleracea. - Acta Bot. Neerl. 21, 387-394

TISCHNER, R., 1974: Physiologische Veränderungen synchroner Chlorella nach Hitzebehandlung unter besonderer Berücksichtigung der hitzeempfindlichsten Phase. - Dissertation Göttingen, 96 S.

TISCHNER, R. and H. LORENZEN, 1974: Effect of high growth temperature on cell compounds and enzymes in synchronized Chlorella. - New Botanist 1, 72-88

TISCHNER, R. und H. LORENZEN, 1975: Physiologische Auswirkungen von Hitzeschocks auf synchrone Chlorellen im empfindlichsten Entwicklungsstadium. - Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 233-245

VERNON, L.P. and E.R. SHAW, 1969: Photoreduction of 2,6 dichlorphenolindophenol by diphenylcarbazide: a photosystem 2 reaction catalyzed by tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragments. - Plant Physiol. 44, 1645-1649

WANKA, F., 1968: Über die Induktion der Zellteilung in synchronen Chlorella-Kulturen. - Planta 79, 65-76

WARBURG, O., G. KRIPPAHL und W. SCHRÖDER, 1954: Katalytische Wirkung des blaugrünen Lichts auf den Energieumsatz bei der Photosynthese. - Z. Naturforsch. 9b, 667-675

WARBURG, O. und W. LÜTTGENS, 1946: Photochemische Reduktion des Chinons in grünen Zellen und Granula. - Biokhimia 11, 303-309

WIESSNER, W. and C.S. FRENCH, 1970: The forms of native chlorophyll in Chlamydobotrys stellata and their changes during adaption from photoheterotrophic to autotrophic growth. - Planta 94, 78-90

WITT, H.T., 1971: Coupling of quanta, electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis. - Quart. Rev. Biophys. 4, 365-477

WOLF, G., 1964: Die Atmung von Chlorella im Verlauf der Zellentwicklung. - Dissertation Göttingen, 28 S.

WRIGHT, M. and E.W. SIMON, 1973: Chilling injury in cucumber leaves. - J. exp. Bot. 24, 400-411

WUNDERLICH, F., V. SPETH, W. BATZ, and H. KLEINIG, 1973: Membranes of Tetrahymena III: The effect of temperature on membrane core structures and fatty acid composition of Tetrahymena cells. - Biochim. Biophys. Acta 298, 39-49

YENTSCH, C.S. and R.R.L. GUILLARD, 1969: The absorption of chlorophyll b in vivo. - Photochem. Photobiol. 9, 385-388

ZSCHEILE, F.P. and C.L. COMAR, 1941: Influence of preparative procedure on the purity of chlorophyll components as shown by absorption spectra. - Bot. Gaz. 102, 463-491

ZSCHEILE, F.P., J.W. WHITE, B.W. BEADLE, and J.R. ROACH, 1942: The preparation and absorption spectra of five pure carotenoid pigments. - Plant Physiol. 17, 331-346

Herrn Prof. Dr. H. Lorenzen danke ich für die Überlassung des Themas und für seine stete Bereitschaft zu klärender Diskussion.

Mein Dank gilt außerdem allen meinen früheren Kollegen vom Pflanzenphysiologischen Institut und insbesondere vom Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, die mir durch Diskussion sowie Bereitstellung von Material und Geräten behilflich waren.

Lebenslauf

Rolf Rüdiger Nelle, geboren am 7. Juni 1942 in Kassel, als Sohn des Werner Nelle und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Oppermann.

1949 - 1953	Volksschule in Karlshafen, Kreis Kassel
1953 - 1959	Landgraf-Carl-Schule, Gymnasium in Karlshafen
1959 - 1962	Albert-Schweitzer-Schule, Gymnasium in Hofgeismar
1962 - 1964	Bundeswehrdienst
1964 - 1970	Studium an der Universität Göttingen
15.6.1970	1. Staatsexamen in den Fächern Biologie, Chemie und Pädagogik
6.7.1970	Diplom in Biologie
1.12.1970 - 31.1.1976	Wissenschaftlicher Assistent am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Lorenzen am Pflanzenphysiologischen Institut durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer in den Hauptfächern waren die Herren Professoren:

Amelunxen, Ax, Bergmann, Birukow, Brockmann, Ellenberg, Glemser, Heberer, Hilsch, Jacobi, Lorenzen, Piepho, Pirson, Schlegel, Schlote, Schnepf, Trebst und Wießner.